

H₂S 信号对含水甘蓝种子程序降温条件下耐冻性的影响

王秀丽, 韩颖颖, 李良波, 宋丹萍, 李维杰, 刘宝林

(上海理工大学 健康科学与工程学院, 上海 200093)

摘要: 为了探究 H₂S 对种子球蛋白解聚和水解的影响, 对含水甘蓝种子加入硫氢化钠(NaHS), 在程序降温(-60 °C/h)处理条件下研究 H₂S 对含水甘蓝种子耐冻性以及球蛋白水解的影响。测定程序降温条件下含水甘蓝种子的发芽率, 采用差示量热扫描探究种子内部冰晶形成的起始温度和放热焓值, 抽取种子总蛋白进行双向电泳实验, 找到差异蛋白点用以质谱鉴定。对小分子多肽进行回收, 在低温显微镜下观察冰晶形成模式, 最后测定巯基和二硫键的浓度。结果表明: 在程序降温条件下, 外源添加 5 mmol/L NaHS 显著提高了含水甘蓝种子的发芽率, 且 NaHS 处理的种子内部冰晶形成温度出现显著性后移, 总巯基含量明显增加; 双向电泳实验结果显示, 与对照组相比, 处理组在较小分子量区域(<25 kDa)存在 2 个差异蛋白点, 质谱鉴定得出差异蛋白点主要为 2 S 白蛋白、12 S 球蛋白、40 S 核糖体蛋白。不同大小的分子多肽, 分子量越小, 冰晶形成的温度越低, 且在降温过程中形成的冰晶越小越圆润。综上所述, 促进二硫键的还原以及球蛋白小分子多肽的降解是硫氢化钠促进低温条件下含水甘蓝种子存活的主要原因。

关键词: 甘蓝; 耐冻性; 含水种子; NaHS; 种子贮藏球蛋白水解

中图分类号: Q 945.78

文献标志码: A

Effect of H₂S signal on freezing tolerance of hydrated brassica seeds under programmed cooling

WANG Xiuli, HAN Yingying, LI Liangbo, SONG Danping, LI Weijie, LIU Baolin

(School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: To investigate the effects of H₂S on the depolymerization and hydrolysis of seed globulins, hydrated brassica seeds were exposed to a hydrogen sulfide donor (NaHS) under programmed cooling

收稿日期: 2024-07-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31750110474)

第一作者: 王秀丽(1999—), 女, 硕士研究生。研究方向: 低温生物学。E-mail: xlwang736@163.com

通信作者: 韩颖颖(1977—), 女, 副教授。研究方向: 低温生物学。E-mail: yyhan2007@163.com

引文格式: 王秀丽, 韩颖颖, 李良波, 等. H₂S 信号对含水甘蓝种子程序降温条件下耐冻性的影响[J]. 上海理工大学学报, 2025, 47(4): 430-437.

Citation: WANG Xiuli, HAN Yingying, LI Liangbo, et al. Effect of H₂S signal on freezing tolerance of hydrated brassica seeds under programmed cooling[J]. Journal of University of Shanghai for Science and Technology, 2025, 47(4): 430-437.

conditions (−60 °C/h). The cryotolerance of the seeds and the extent of globulin hydrolysis were assessed. Germination rates were evaluated following programmed cooling. Differential scanning calorimetry (DSC) was employed to determine the onset temperature of ice formation and the associated enthalpy change. Total seed proteins were extracted for two-dimensional electrophoresis (2-DE), and differentially expressed protein spots were identified using mass spectrometry. Small-molecular-weight peptides were isolated, and ice crystal formation patterns were analyzed via cryomicroscopy. Additionally, the concentrations of free thiols and disulfide bonds were quantified. The results demonstrated that the exogenous application of 5 mmol/L NaHS significantly enhanced the germination rate of hydrated brassica seeds under programmed cooling conditions. The onset temperature of internal ice formation was markedly delayed in NaHS-treated seeds, and the total thiol content was substantially higher in the NaHS-treated group compared to the control. Two-dimensional electrophoresis revealed two differentially expressed protein spots in the low-molecular-weight region (<25 kDa). Mass spectrometry identified these spots as 2 S albumin, 12 S globulin, and 40 S ribosomal protein. These smaller peptides exhibited lower ice nucleation temperatures and formed smaller, more rounded ice crystals during cooling. In conclusion, the promotion of disulfide bond reduction and the degradation of globulin-derived small peptides represent critical mechanisms by which NaHS enhances the survival of water-containing brassica seeds under low-temperature stress.

Keywords: *brassica; freezing tolerance; hydrated seeds; NaHS; hydrolysis of seed storage globulin*

种子含水量的差异是种子低温保存成功与否的关键因素。Roberts^[1]和Ellis等^[2]根据种子对于干燥和低温的反应,将其保存类型分为正常型种子、顽拗型种子和中间型种子。正常型种子可干燥至种子内部含水量低于7%,并能在低温下贮藏几十甚至上百年^[3]。与之相反,顽拗型种子在发育末期不经历成熟脱水,在脱落时含水量较高,且含水量低于30%时,顽拗型种子无法存活^[4],对冷冻条件更敏感^[5]。目前,有1/3的高度濒危物种是顽拗型种子^[6-7]。因此,研究高含水量种子的耐冻性机制,对于顽拗型种子的种质资源保存以及提高种子的耐冻性具有重要的价值。

H₂S被认为是植物应对环境胁迫的重要信号^[8-9],在抵御低温、干旱、盐害、重金属污染等非生物胁迫中发挥重要作用^[10-14]。NaHS作为H₂S的供体,是一种硫化化试剂,可通过将目标蛋白质中Cys的巯基(—SH)转化为硫巯基(—SSH)来调节蛋白质的结构和功能,提高植物对低温等环境胁迫的适应能力^[9,15-16]。前人研究发现,NaHS预处理也可使低温下植物的抗氧化能力和渗透调节能力增强^[8],从而提高植物低温耐冻性。本课题组近年来的研究发现,降温过程中种子球蛋白水解多肽得到积累,从而保护种子胚免受冻害^[17-18]。

甘蓝是一种正常型种子,研究饱和吸水甘蓝种子可以为顽拗型种子低温保存提供借鉴。考虑到种子球蛋白由二硫键链接的两个亚基组成,H₂S可以通过攻击蛋白质二硫键(—S—S—)以便形成硫巯基。本研究选取含水甘蓝种子为研究对象,通过外源添加NaHS,探究其在程序降温条件(−60 °C/h)下的相关抗冻机理,为顽拗型种子的低温保存提供参考。

1 实验仪器、材料方法

1.1 材料与试剂

材料为“秋甜2号”甘蓝种子,购自山东寿禾种业欣欣然公司;NaHS和PAGE胶蛋白微量回收试剂盒、SDS-PAGE丙烯酰胺快速制备试剂盒、琼脂粉、异丙醇、DEPC水、乙醇、三氯甲烷等均购自生工生物有限公司(上海);等电聚焦实验中的第一向胶条购自伯乐公司(美国)。

1.2 仪器和设备

实验所用仪器和设备为PLANERkryo程序降温仪(英国)、GZX-250B光照培养箱(中国通利信达)、差示扫描量热仪(德国耐驰公司)、Powerpac Basic电泳仪(美国)、低温显微镜(日本)、等电聚

焦系统(伯乐,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 种子吸胀及程序降温下甘蓝种子半致死温度的测定

参照鲍红艳等^[19]的方法,将甘蓝种子进行吸胀处理后,取出种子擦干表面水分,置于程序降温仪中,设置降温速率为-60℃/h,温度梯度为-15、-20、-22、-25℃,观察其发芽率。

1.3.2 NaHS 处理的最适浓度测定

将种子分别撒到含有终浓度为0、0.1、0.5、1、2、5、10 mmol/L NaHS 的质量分数为1%的琼脂培养基上,进行吸胀处理。将不同处理的种子放置到程序降温仪(Kryo series III)中,按照上述所确定的半致死温度,将程序降温仪调整至终温-22℃,降温速率以-60℃/h进行程序降温处理。

1.3.3 含水量的测定

种子进行吸胀处理后,参照周强等^[20]的热烘干法测定种子水分含量,在103℃的常规烘箱中烘干17h,通过计算干燥种子重量与新鲜种子重量之间的比率(以百分比表示)来进行评估。最终水分含量以4次测量的算术平均数表示为

$$M_c = \frac{M_1 - M_2}{M_2} \times 100\%$$

式中: M_c 表示含水量; M_1 表示种子吸胀后的质量; M_2 表示种子烘干后的质量。

1.3.4 发芽率的测定

种子进行吸胀处理后,室温下复温30min,取25粒种子播种到琼脂质量分数为1%的培养基中,不同浓度的样品做3组平行实验。在光照培养箱中培养,连续5d观察种子的发芽情况^[21],种子萌发定义为胚轴伸长3mm及以上。最终发芽率表示为

$$G = \frac{Q_1}{Q_2} \times 100\%$$

式中: G 表示发芽率; Q_1 表示实验种子发芽总数; Q_2 表示实验种子总数。

1.3.5 差示扫描量热仪(DSC)分析实验

分别将样品放入DSC坩埚中,进行差示扫描量热仪(differential scanning calorimeter, DSC)实验,按照程序降温的过程设置DSC降温程序,并使用DSC-Analysis软件计算冰晶形成的起始温度和放热焓值。

1.3.6 巯基和二硫键的含量测定

巯基和二硫键的含量测定按照李良波等^[17]

的实验方法。其中,巯基的含量计算如下:

$$C = A \frac{K}{\epsilon c}$$

式中: C 表示巯基浓度或二硫键的质量摩尔浓度(mol/105g); A 表示混合物的吸光度; K 表示稀释比; ϵ 表示摩尔消光系数; c 表示蛋白质的质量浓度。

1.3.7 总蛋白提取和双向电泳实验

经过程序降温处理的不同摩尔浓度的甘蓝种子,采用TCA丙酮法提取种子的总蛋白,双向电泳参考杨君等^[22]的实验操作,最后使用质谱鉴定(生工生物工程(上海)有限公司)差异蛋白。

1.3.8 甘蓝种子球蛋白的SDS-PAGE实验

将程序降温处理后的甘蓝种子,利用液氮研磨法将其研磨成粉末,与1.4mL质量分数为4%的NaCl溶液和2μL摩尔浓度为1mM的PMSF溶液快速混合,50℃水浴1.5h,然后4℃、12000r/min离心10min,取上清液。采用Nanodrop微量分光光度计对蛋白质的质量浓度进行测定,电泳每个样品量保持均一化,质量浓度标定到1mg/mL。接着,进行SDS-PAGE实验,将得到的差异蛋白点保存并送至生工生物工程(上海)有限公司进行质谱分析检测。

1.3.9 小分子球蛋白多肽的低温显微镜观察冰晶形成模式

通过使用PAGE胶蛋白微量回收试剂盒,对球蛋白及其水解多肽进行切胶回收,随后将不同分子量的球蛋白多肽置于低温显微镜的载玻片上,设置其降温速率为-60℃/h,观察冰晶的形成情况。

2 实验结果与分析

2.1 NaHS 提高了含水甘蓝种子的低温耐冻性

将种子存活率50%左右的温度定义为半致死温度。在程序降温条件下,含水甘蓝种子的半致死温度为-22℃(图1(a)),因此,后续程序降温实验均采用程序降温处理至-22℃。外源添加2、5、10 mmol/L的NaHS时,均能提高含水甘蓝种子的发芽率,在5 mmol/L时发芽率达到最高62.2%(图1(b))。这说明在低温冷冻条件下,NaHS处理有一定的保护效果,且在5 mmol/L时最高。

为了探究在非冷冻条件下添加NaHS是否会影响种子的发芽率和含水量,进行常温下含水量和

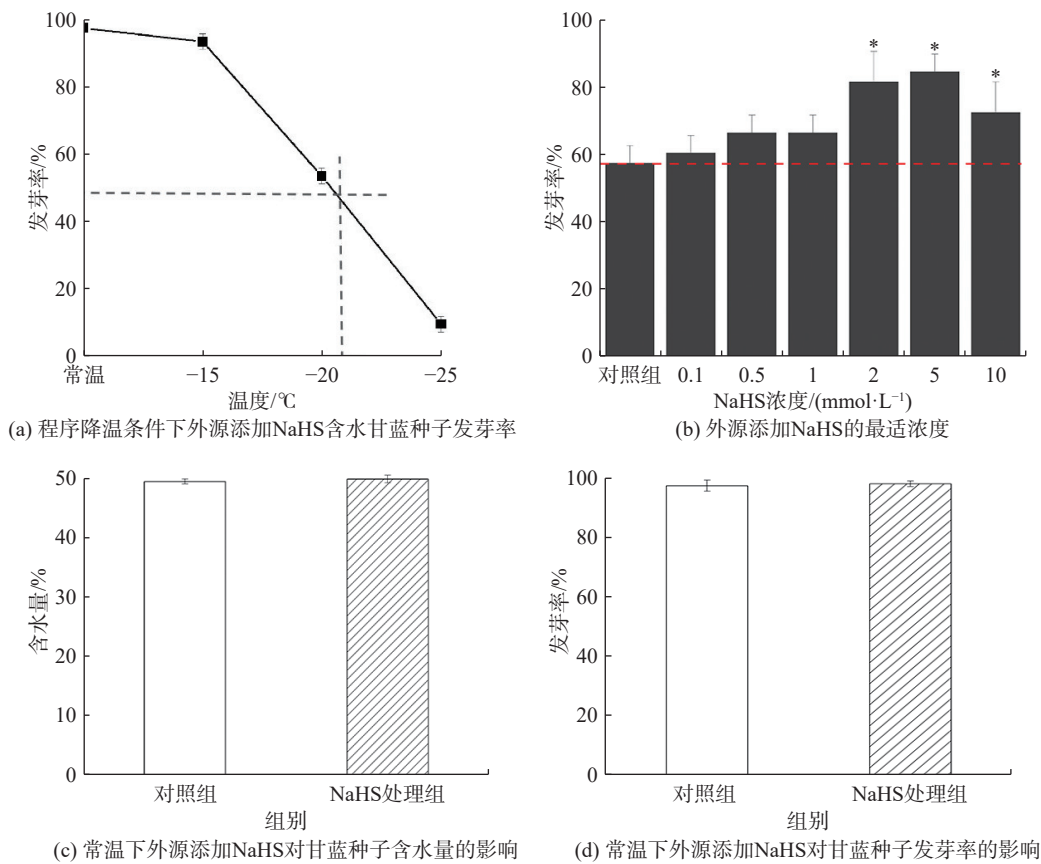


图 1 NaHS 对于含水甘蓝种子耐冻性的影响

Fig.1 Effect of NaHS on freezing tolerance of hydrated brassica seeds

发芽率的测定，如图 1(c) 所示。常温下外源添加 NaHS 对甘蓝种子含水量无显著影响，含水量均在 50 % 左右，说明甘蓝种子耐冻性不受含水量差异的影响。常温下对照组和 NaHS 处理组发芽率均在 96 % 左右，即外源添加 NaHS 对含水甘蓝种子的发芽率无影响(图 1(d)，显著值 $p>0.05$)。

2.2 含水甘蓝种子程序降温过程中的冰晶形成模式

由于 5 mM NaHS 显著提高含水甘蓝种子在程序降温过程中的抗冻能力，将含水种子进行差示量热扫描，确定程序降温过程中种子内部冰晶形成情况(表 1)。程序降温过程中，根据放热曲线，有两次冰晶形成。在对照处理中，第一次冰晶形成发生在 -12 °C 左右，第二次发生在 -13.8 °C。根据以往的研究，第一次冰晶形成发生在胚乳，第二次发生在胚。加入 NaHS 后，第二次(胚内)冰晶形成温度后移，降低结晶温度，这可能是 NaHS 促进含水甘蓝种子耐冻性的原因。

2.3 NaHS 处理增强总巯基浓度

种子球蛋白由二硫键连接的多亚基构成，NaHS 会攻击二硫键，形成硫巯基。由此推测，NaHS 可以打破种子球蛋白二硫键与巯基构象的平

衡，促进二硫键的还原和球蛋白的解聚，导致种子球蛋白的单亚基水解为小分子多肽，从而提高了种子在低温条件下的耐冻性。检测种子在程序降温条件下的巯基和二硫键浓度，结果显示：在常温条件下，对照组和 NaHS 处理组的巯基和二硫键含量没有明显差异；在程序降温条件下，NaHS 处理组的巯基含量明显增加($p<0.05$)，而二硫键含量则没有显著差异(图 2)。NaHS 处理提高了种子在程序降温条件下的存活率，这可能与甘蓝种子二硫键还原以及球蛋白小分子亚基的解聚有关。

2.4 NaHS 处理促进种子贮藏球蛋白水解

为了进一步探究 NaHS 提高含水甘蓝种子的耐冻性原因，提取了种子总蛋白，进行双向电泳。在蛋白质分子量较小的区域(<25 kDa)存在两个差异蛋白点(图 3)。对这两个差异蛋白点进行质谱鉴定发现，分子量为 18.4~25 kDa 的差异蛋白点主要是种子贮存蛋白的 Napin 蛋白或者类 Napin 蛋白混合物(表 2)。分子量为 14.4~18.4 kDa 的差异蛋白点主要是 12 S 球蛋白和 Napin 蛋白混合物(表 3)。两个点均为种子贮存蛋白。考虑到 12 S

表 1 甘蓝种子的 DSC 分析
Tab.1 DSC analysis of *Brassica* seeds

组别	1次结晶温度/℃	1次结晶放热焓值 $\Delta H_1/(\text{J}\cdot\text{g}^{-1})$	2次结晶温度/℃	2次结晶放热焓值 $\Delta H_2/(\text{J}\cdot\text{g}^{-1})$	总放热焓值 $\Delta H/(\text{J}\cdot\text{g}^{-1})$
对照组	-12.22±0.20	-85.20±10.21	-13.80±0.64	-11.47±2.37	-93.42±5.65
NaHS处理组 (5 mM)	-13.02±2.46	-10.54±1.08	-17.07±0.04	-85.20±6.17	-89.65±5.16

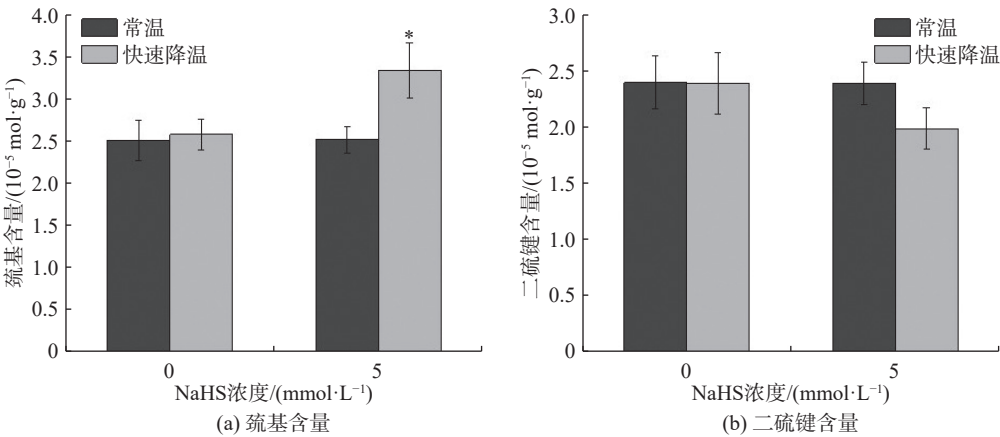


图 2 NaHS 对种子球蛋白巯基和二硫键量的影响
Fig.2 Effect of NaHS on the amount of sulfhydryl and disulfide bonds in seed globulins

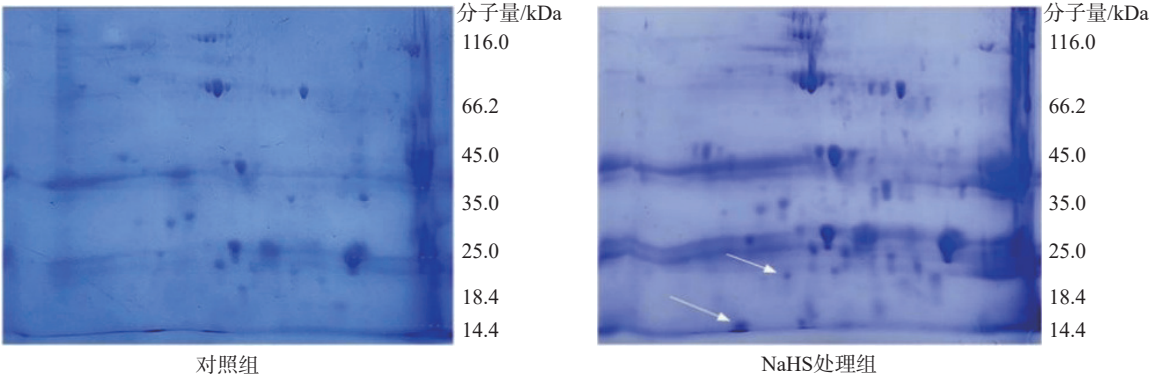


图 3 程序降温下 NaHS 处理的甘蓝种子球蛋白的双向电泳实验结果

Fig.3 Results of bidirectional electrophoresis experiments on NaHS-treated kale seed globulin under rapid cooling

表 2 分子量为 18.4~25 kDa 的差异蛋白点质谱分析
Tab.2 Mass spectrometry analysis of differential protein spots with molecular weights of 18.4~25 kDa

序列编号	基因名称	评分	<i>p</i>
XP_013623354.1	Napin embryo-specific	390	1.4×10^{-7}
XP_013589349.1	napin-like	349	9.2×10^{-8}
XP_013621452.1	napin-2	70	5.8×10^{-6}

表 3 分子量为 14.4~18.4 kDa 的差异蛋白点质谱分析
Tab.3 Mass spectrometry analysis of differential protein spots with molecular weights of 14.4~18.4 kDa

序列编号	基因名称	评分	<i>p</i>
XP_013603897.1	12S seed storage protein CRD	279	8.2×10^{-9}
XP_013623354.1	Napin embryo-specific	224	1.5×10^{-7}
XP_013589349.1	napin-like	162	2.0×10^{-8}

球蛋白和 Napin 蛋白的单亚基分子量约为 27 kDa 左右。因此，可以推测在程序降温过程中，NaHS 促进了甘蓝种子贮藏蛋白的解聚和水解，从而造成了小分子水解多肽的积累。

2.5 球蛋白分子多肽的热物性分析

为了研究水解多肽对种子抗冻性的影响，提

取种子储存球蛋白及其多肽，并通过 SDS-PAGE 对不同分子大小多肽进行分离。在 35 KDa 以下范围内分离得到了 3 个小分子多肽(图 4: A1、A2、A3)，且其分子量逐渐减小。由图 4 可见，对照组和 NaHS 处理组均重复两次，条带粗细不均可能是上样量误差所致。

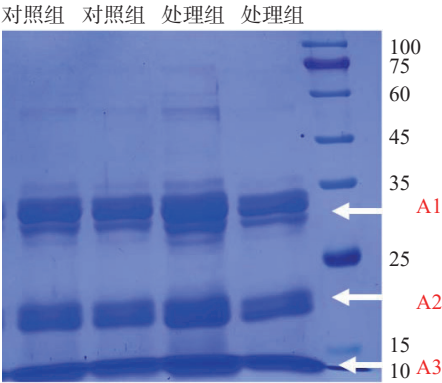


图 4 SDS-PAGE 分离球蛋白水解多肽

Fig.4 Separation of globulin hydrolyzed polypeptides by SDS-PAGE

对不同大小的蛋白水解多肽进行差示扫描量热仪分析发现, 随着小分子多肽分子量的减小, 多肽的总放热焓值呈逐渐减小的趋势(表 4)。这表明分子量越低, 降温过程中形成的冰晶越小, 种子球蛋白水解能够保护种子胚可能与此有关。同时, 根据 DSC 分析, 分子量越小, 冰晶形成温度越低。由此可以推测, 程序降温过程中, 小分子多肽提高了渗透势, 促进了胚过冷效应, 降低了胚冷冻伤害。这与针对种子的 DSC 和双向电泳测定结果一致, 也就是 NaHS 促进了小分子多肽的积累, 降低了冰晶形成温度(表 1)。

表 4 不同分子量大小的球蛋白多肽的 DSC 分析
Tab.4 DSC analysis of globin polypeptides with different molecular weight

组别	冰晶起始温度/℃	$\Delta H_f/(J \cdot g^{-1})$
A1-混	-16.04±1.02	-235.66±6.94
A2-对照组	-22.19±1.14	-100.97±5.91
A2-NaHS	-27.96±2.56	-190.23±10.37
A3-对照组	-31.04±1.72	-166.30±10.18
A3-NaHS	-26.26±1.04	-174.57±11.74

进一步用低温显微镜观察不同大小的球蛋白水解多肽形成冰晶的过程(图 5)。多肽分子量越大, 形成冰晶越大, 并呈树枝状; 多肽的分子量越小, 形成冰晶越圆滑。这进一步证明了小分子多肽的低温保护特性。

3 讨 论

已有的研究表明, 种子球蛋白的解聚和水解都与种子耐冻性提高有关^[17-18]。基于种子球蛋白由

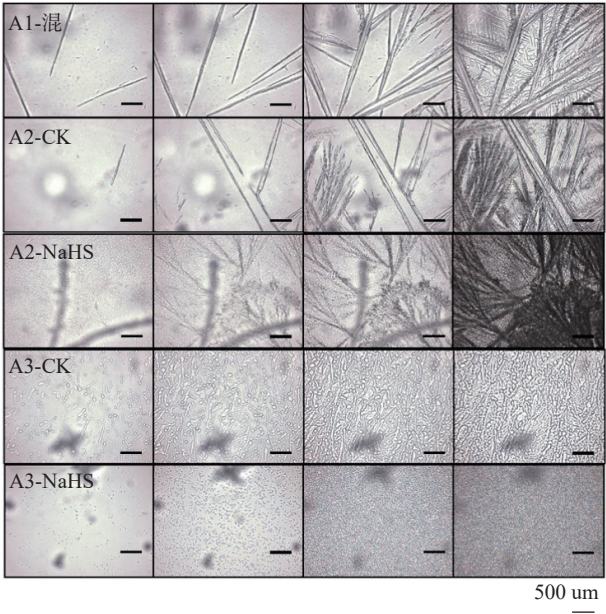


图 5 -22 °C 时球蛋白多肽的冰晶显微镜观察

Fig.5 Microscopic observation of ice crystals in globulin polypeptides at -22 °C

二硫键链接的多个亚基组成, H₂S 可以攻击二硫键, 形成硫疏基, 进而促进种子球蛋白解聚和水解。本研究以甘蓝种子为研究对象, 通过外源添加 NaHS 试剂(H₂S 供体)处理, 在程序降温条件下探究其对甘蓝种子低温耐冻的影响。结果表明, NaHS 处理显著提高了含水甘蓝种子的发芽率。DSC 实验显示, NaHS 处理组的冰晶形成温度显著后移, 表明 NaHS 能够促进过冷效应, 降低甘蓝种子胚内冰晶形成温度, 从而保护种子免受冻害。

双向电泳结果显示, NaHS 处理促进甘蓝种子贮藏蛋白的水解。对小分子多肽进行抽提回收, 低温显微镜观察其冰晶形成过程, 发现分子量越小, 形成的冰晶越圆润, 球蛋白解聚和水解与种子的低温损伤降低有关。疏基与二硫键的测定结果显示, 在程序降温条件下, NaHS 处理组的总疏基含量增加, 表明 NaHS 促进了二硫键的还原, 这可能是 NaHS 提高小分子多肽降解, 而且能够降低甘蓝种子低温损伤的主要原因。

在低温胁迫下, 种子球蛋白的解聚产生小分子多肽, napin 蛋白也可能参与小分子多肽的生成。Ericson 等^[23]探讨了油菜籽中的 1.7 S 储存蛋白 napin 的结构和前体, 发现像 napin 这样的储存蛋白通过二硫键连接的两个多肽亚基可以发生水解, 产生小分子多肽。这些小肽在种子萌发时提供必需的氨基酸, 还通过稳定细胞膜和细胞质, 帮助细胞抵抗冷冻伤害。

在动物组织中,大冰晶的挤压作用可导致肌原纤维和纤维周围的结缔组织碎裂,然后被活性酶降解^[24-25]。此外,发现分布不均匀的大冰晶可能会不可逆地导致组织破裂和细胞内容物泄漏。在植物组织中,冰晶的形成可能导致细胞结构(尤其是细胞膜)的破坏和细胞内黏附的减弱,从而导致组织膨胀丧失和软化^[26]。当种子暴露在低温下时,温度越低,种子对冰冻压力越敏感,因为冰晶形成过程中的温度变化会导致细胞损伤。胚胎中形成的冰晶数量越多,对种子的损害程度亦越显著^[27]。冰晶的大小和形态决定了其对细胞的破坏程度。李维杰等^[28]在研究升温速率对低温保护剂结晶性质影响时发现,冰晶为鱼鳞状的表面凹凸有致,会撕裂细胞,树枝状的冰晶,会扎破细胞膜,引起细胞损伤。而当两种低温保护剂都表现出不同程度的玻璃化,即结晶呈荷包蛋状散落在视野中,冰晶形态圆滑,没有棱角,不易刺伤细胞。本研究中,低温显微镜观察发现小分子多肽形成的冰晶更小,且圆滑,表明 NaHS 处理可能通过改变冰晶的大小及形态,减少对种子胚的冷冻伤害。

抗冻性调控是一个复杂的过程,涉及多个生理和分子机制。首先,渗透调节物质如脯氨酸、甜菜碱等在低温下通过维持细胞内水平平衡起到了关键作用,尤其是减少细胞脱水和防止细胞膜损伤^[29]。其次,抗氧化系统能够通过清除活性氧(ROS),减少低温引发的氧化损伤^[30]。最后,ABA 等内源激素可以调控低温胁迫下基因的表达,促进抗冻蛋白的积累,增强植物耐寒性^[31]。因此,NaHS 促进种子贮存蛋白的水解,也可能通过调控抗氧化系统和渗透调节物质的积累来增强种子的抗冻性。

4 结论和展望

本研究通过添加 NaSH 研究 H₂S 信号对种子球蛋白亚基解聚以及水解的影响,发现 H₂S 信号导致种子球蛋白硫烷基化,促进种子球蛋白的降解,保护种子胚。另外,球蛋白分子量越低,其冰晶形成越小越圆润,这可能是 H₂S 造成种子耐冻性的原因。

尽管本研究取得了一些成果,但仍存在一些局限性。首先,实验仅在甘蓝种子中进行了验

证,尚不清楚 NaHS 处理对其他作物是否具有类似的效果。其次,虽然实验通过双向电泳和差示扫描量热法分析了 NaHS 对蛋白质和冰晶形成的影响,但对于其他潜在的分子机制(如抗氧化酶活性和内源激素水平变化)的影响尚未深入探讨。未来研究应结合更多的分子生物学手段,全面解析 NaHS 的作用机制。最后,NaHS 是否进入甘蓝种子内部?如何检测 NaHS 进入种子内部的具体含量?以及 NaHS 是否对种子球蛋白二硫键具有破坏作用?这些问题在目前实验条件下还不能确定,未来的研究将重点关注这些领域。

除了种子球蛋白的解聚和水解,未来可以深入研究 NaHS 是否通过调控抗氧化酶系统、渗透调节物质和内源激素(如脱落酸)的信号途径来增强植物抗冻性。在提高种子抗冻性方面,基因编辑技术和外源处理手段是两个重要的方向。CRISPR/Cas9 技术可以用于调控抗冻基因的表达^[32],从而提升植物在低温条件下的适应性。外源处理如 NaHS 的应用在本研究中表现出了较好的效果,通过优化其施用条件,可以进一步提升其对不同植物种子的抗冻效果。

参考文献:

- [1] ROBERTS E H. Predicting the storage life of seeds[J]. Seed Science & Technology, 1973, 1: 499-514.
- [2] ELLIS R H, HONG T D, ROBERTS E H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. COFFEE[J]. Journal of Experimental Botany, 1990, 41(9): 1167-1174.
- [3] ZHOU D D, LUO M, HUANG S Y, et al. Effects and mechanisms of resveratrol on aging and age-related diseases[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021: 9932218.
- [4] OYERINDE R O, NGOBESE N Z, PAMMENTER N W, et al. Desiccation and chilling sensitivity of the recalcitrant seeds of *Trichilia dregeana* harvested from two provenances[J]. South African Journal of Botany, 2023, 156: 376-384.
- [5] BERJAK P, PAMMENTER N W. Recalcitrance[J]. Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition), 2017, 1: 532-539.
- [6] CORLETT R T. Achieving zero extinction for land plants[J]. Trends in Plant Science, 2023, 28(8): 913-923.
- [7] CORLETT R T. Plant diversity in a changing world: status, trends, and conservation needs[J]. Plant Diversity, 2016, 38(1): 10-16.
- [8] LUO Z S, LI D D, DU R X, et al. Hydrogen sulfide

- alleviates chilling injury of banana fruit by enhanced antioxidant system and proline content[J]. *Scientia Horticulturae*, 2015, 183: 144–151.
- [9] ZHANG Z, FANG X, YANG X W, et al. Hydrogen sulfide donor NaHS alters antibody structure and function via sulfhydration[J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 73: 491–501.
- [10] GAUTAM S, BHARDWAJ S, KAPOOR D. Role of H₂S in plants: a current update[M]//SINGH S, SINGH V P, TRIPATHI D K, et al. *Hydrogen Sulfide in Plant Biology*. Amsterdam: Elsevier, 2021: 133–147.
- [11] HUANG D J, HUO J Q, LIAO W B. Hydrogen sulfide: roles in plant abiotic stress response and crosstalk with other signals[J]. *Plant Science*, 2021, 302: 110733.
- [12] LIU H, WANG J C, LIU J H, et al. Hydrogen sulfide (H₂S) signaling in plant development and stress responses[J]. *aBIOTECH*, 2021, 2(1): 32–63.
- [13] CORPAS F J, PALMA J M. H₂S signaling in plants and applications in agriculture[J]. *Journal of Advanced Research*, 2020, 24: 131–137.
- [14] 杨蕊蕊, 冯丽, 方华, 等. 硫化氢和油菜素内酯协同增强番茄幼苗耐盐性 [J/OL]. [2024-04-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/62.1055.s.20240428.1059.043.html>
- [15] JU Y, FU M, STOKES E, et al. H₂S-mediated protein S-sulfhydration: a prediction for its formation and regulation[J]. *Molecules*, 2017, 22(8): 1334.
- [16] PAUL B D, SNYDER S H. Modes of physiologic H₂S signaling in the brain and peripheral tissues[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2015, 22(5): 411–423.
- [17] 李良波, 韩颖颖, 王秀丽, 等. 快速冷却过程中 DTNB 对含水甘蓝种子耐冻性的影响 [J]. *制冷学报*, 2024, 45(5): 159–166.
- [18] HAN Y Y, LI L B, LI W J, et al. De-polymerisation and hydrolysis of seed storage protein is involved in the freezing tolerance of hydrated *Brassica oleracea* seeds[J]. *Seed Science and Technology*, 2023, 51(3): 407–419.
- [19] 鲍红艳, 于影, 邓佳宝, 等. 蛋白酶抑制剂对含水生菜种子耐冻性的影响 [J]. *亚热带植物科学*, 2021, 50(6): 461–470.
- [20] 周强, 韩颖颖, 沈梦琪, 等. 程序降温处理过程中 Nutlin-3 对含水生菜种子抗冷性的影响 [J]. *上海农业学报*, 2018, 34(2): 33–38.
- [21] 龚晓崇, 宋从凤, 王鸣华, 等. 高效液相色谱法测定烟草和棉花中生长素含量 [J]. *江苏农业学报*, 2012, 28(1): 225–227.
- [22] 杨君, 杨云强, 杨永平, 等. 箭毒木种子蛋白质样品制备及双向电泳改良方法 [J]. *云南植物研究*, 2009, 31(4): 357–362.
- [23] ERICSON M L, RÖDIN J, LENMAN M, et al. Structure of the rapeseed 1.7 S storage protein, napin, and its precursor[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1986, 261(31): 14576–14581.
- [24] PIETRASIK Z, JANZ J A M. Influence of freezing and thawing on the hydration characteristics, quality, and consumer acceptance of whole muscle beef injected with solutions of salt and phosphate[J]. *Meat Science*, 2009, 81(3): 523–532.
- [25] ZHANG M C, LI F F, DIAO X P, et al. Moisture migration, microstructure damage and protein structure changes in porcine longissimus muscle as influenced by multiple freeze-thaw cycles[J]. *Meat Science*, 2017, 133: 10–18.
- [26] ZHU Z W, ZHOU Q Y, SUN D W. Measuring and controlling ice crystallization in frozen foods: a review of recent developments[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 90: 13–25.
- [27] JAGANATHAN G K, LIU B. Effects of dimethyl sulfoxide concentration, pre-cooling and cooling rate on cryopreservation of hydrated lettuce seeds[J]. *Seed Science and Technology*, 2014, 42(2): 214–226.
- [28] 李维杰, 周新丽, 刘宝林, 等. 升降温速率对低温保护剂溶液结晶性质的影响 [J]. *化工学报*, 2013, 64(8): 2969–2974.
- [29] 邵艳军, 山仑. 植物耐旱机制研究进展 [J]. *中国生态农业学报*, 2006, 14(4): 16–20.
- [30] 李格, 孟小庆, 蔡敬, 等. 活性氧在植物非生物胁迫响应中功能的研究进展 [J]. *植物生理学报*, 2018, 54(6): 951–959.
- [31] 李馨园, 杨晔, 张丽芳, 等. 外源 ABA 对低温胁迫下玉米幼苗内源激素含量及 *Asr1* 基因表达的调节 [J]. *作物学报*, 2017, 43(1): 141–148.
- [32] 王莹婕, 马玲玲, 梁振. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术及其在作物遗传改良中的应用进展 [J]. *山西农业科学*, 2021, 49(12): 1383–1392.

(编辑: 丁红艺)