

DOI:10.11686/cyxb2024506

http://cyxb.magtech.com.cn

孙守江, 刘昊臻, 徐淑涵, 等. 苜蓿种子发芽特性和萌发早期抗氧化系统对老化的生理和分子响应研究. 草业学报, 2025, 34(11): 195—204.

SUN Shou-jiang, LIU Hao-zhen, XU Shu-han, et al. Germination characteristics and antioxidant responses of alfalfa seeds to aging treatment. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(11): 195—204.

## 苜蓿种子发芽特性和萌发早期抗氧化系统 对老化的生理和分子响应研究

孙守江\*, 刘昊臻, 徐淑涵, 张景铨, 李淑霞, 张金青, 高雪芹, 伏兵哲

(宁夏大学林业与草业学院, 宁夏 银川 750021)

**摘要:**为研究老化苜蓿种子发芽特性、萌发早期抗氧化系统生理变化规律以及探索抗氧化相关基因对种子老化的响应模式,以老化紫花苜蓿种子为材料,研究了老化处理后种子发芽特性、萌发早期种子抗氧化酶活性和抗氧化物含量的变化规律,并分析了抗氧化系统相关基因表达量的变化。结果表明,老化处理不仅抑制了苜蓿种子萌发进程,同时显著影响了种子萌发后幼苗的正常生长,导致萌发后期幼苗较小。老化处理也严重影响了活性氧(ROS)的代谢,导致老化种子萌发早期过氧化氢( $H_2O_2$ )含量升高,过氧化物酶(POD)和谷胱甘肽还原酶(GR)活性显著( $P < 0.05$ )降低,抗坏血酸(AsA)和谷胱甘肽(GSH)含量也极显著( $P < 0.01$ )降低。抗氧化酶活性和抗氧化物含量降低使种子抗氧化能力降低。此外,老化处理也显著( $P < 0.05$ )抑制了抗氧化系统中MsCAT1、MsPOD12、MsDHAR、MsGR1、MsFe-SOD和MsMn-SOD的表达。基于抗氧化生理和基因表达模式分析,从抗氧化系统中挖掘到一些关键的候选基因,为深入研究种子老化的分子调控机制提供了重要基因资源,也为进一步研究这些候选基因调控种子活力的精确途径奠定了基础。

**关键词:**紫花苜蓿;发芽特性;萌发早期;抗氧化酶;抗氧化物;分子响应

## Germination characteristics and antioxidant responses of alfalfa seeds to aging treatment

SUN Shou-jiang\*, LIU Hao-zhen, XU Shu-han, ZHANG Jing-hong, LI Shu-xia, ZHANG Jin-qing, GAO Xue-qin, FU Bing-zhe

College of Forestry and Grassland Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

**Abstract:** The aims of this study were to investigate the germination characteristics of aged alfalfa (*Medicago sativa*) seeds, the physiological changes in their antioxidant system during the early stage of germination, and the responses of antioxidant-related genes to seed aging. We observed seed germination characteristics and determined antioxidant enzyme activities and antioxidant contents during the early stage of germination following an aging treatment, and analyzed the transcript profiles of genes related to the antioxidant system. The results show that an aging treatment not only inhibited the germination of alfalfa seeds, but also significantly affected seedling growth after germination, leading to smaller seedlings. The aging treatment also severely impacted the metabolism of reactive oxygen species, resulting in increased  $H_2O_2$  levels during early germination of aged seeds, a significant decrease in the activities of the

收稿日期:2024-12-25;改回日期:2025-02-19

基金项目:宁夏自然科学基金(2025A1211)资助。

作者简介:孙守江(1990—),男,甘肃景泰人,博士。E-mail: shoujiangsun@nxu.edu.cn

\*通信作者 Corresponding author. E-mail: shoujiangsun@nxu.edu.cn

antioxidant enzymes peroxidase and glutathione reductase, and a marked reduction in the contents of the antioxidants ascorbic acid and glutathione. The decrease in antioxidant enzyme activity and antioxidant content reduced the seeds' antioxidant capacity. Additionally, the aging treatment led to significantly lower transcript levels of *MsCAT1*, *MsPOD12*, *MsDHAR*, *MsGR1*, *MsFe-SOD*, and *MsMn-SOD*, which encode important enzymes in the antioxidant system. On the basis of analyses of antioxidant physiology and gene transcript profiles, several key candidate genes in the antioxidant system were identified. These genes will be important targets for further research on the molecular regulation of seed aging. The results of this study lay the foundation for further studies on the precise pathways through which these candidate genes regulate seed vigor.

**Key words:** alfalfa; germination characteristics; early germination stage; antioxidant enzyme; antioxidant; molecular response

种子老化是种子储存过程中不可避免的现象,会导致种子发芽率下降、幼苗一致性降低和田间抗逆性减弱,从而与农业生产、粮食安全和种质资源保护密切相关<sup>[1]</sup>。遗传和环境因素参与了种子老化过程,通常引发一系列物理化学和生理特性的变化<sup>[2]</sup>。尽管种子老化的机制已经吸引了人们长期关注,但目前仍存在许多假说,例如活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累攻击、有毒物质的影响以及细胞结构和大分子的功能障碍<sup>[3]</sup>。因此,全面理解种子老化过程中的抗氧化生理规律和ROS解毒机制将有助于提高种子活力。

通常,ROS积累被认为是种子老化的主要原因之一,因为它会损害细胞组分,包括核酸、脂类和蛋白质<sup>[4-5]</sup>。在种子中,除了发育初期阶段外,线粒体电子传递链(mitochondrion electron transport chain, mtETC)是ROS的主要来源<sup>[5]</sup>。mtETC产生的超氧阴离子(superoxide anion,  $O_2^{\cdot-}$ )可以转化为具有强氧化能力和长寿命的过氧化氢(hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )<sup>[6]</sup>。在植物的抗氧化防御系统中,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)通过将 $O_2^{\cdot-}$ 转化为 $H_2O_2$ ,提供了第一道保护屏障。随后,过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)和抗坏血酸-谷胱甘肽(ascorbate-glutathione, AsA-GSH)循环将 $H_2O_2$ 转化为水( $H_2O$ )<sup>[7]</sup>。GSH和AsA在细胞器中以mmol浓度存在,可以直接清除ROS或作为电子供体参与ROS处理酶的作用<sup>[7]</sup>。抗氧化防御系统中的酶,例如抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)和单脱氢抗坏血酸还原酶(monodehydroascorbate reductase, MDHAR),协同作用以维持ROS的稳态。此外,抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)和去氢抗坏血酸(dehydroascorbic acid, DHA)在不同的氧化还原状态间循环,进一步增强了抗氧化能力。此外,GR和MDHAR可以利用还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)作为电子供体再生AsA和GSH<sup>[7]</sup>。交替氧化酶(alternative oxidase, AOX)途径在维持mtETC中的电子流动和减少不利条件下的ROS产生方面也能发挥重要作用<sup>[4]</sup>。此外,在种子贮藏和早期发芽阶段经常发生的无氧呼吸也是一种对抗ROS的保护策略<sup>[8]</sup>。在这个过程中,乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)是关键酶,它由LDHA和LDHB基因编码的两个亚基组成。在抗氧化损伤方面,AOX途径和无氧呼吸可能在维持种子活力方面发挥作用。研究表明,抗氧化系统在种子老化过程中发挥重要作用。例如,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)GR2、去氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR1)和硫氧还蛋白(Trx-o1)突变体在老化处理后表现出种子活力下降的表型<sup>[9-10]</sup>。相反,同时过表达Cu/Zn-SOD和APX基因的烟草(*Nicotiana tabacum*)能够在各种环境胁迫条件下提高种子的寿命和发芽能力<sup>[11]</sup>。此外,ROS不仅是导致氧化损伤的元凶,同时还作为信号分子与其他老化响应调节因子[(如丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联反应和各种转录因子)进行交互,从而与种子活力密切相关<sup>[10,12]</sup>。因此,全面探索抗氧化系统对种子老化的响应机制具有重要意义。

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是多年生草本植物,是全球分布最广的豆科牧草之一,也是全球种植面积最大的牧草,同时在草原畜牧业发展和生态环境建设中也发挥着至关重要的作用<sup>[13]</sup>。逆境胁迫会加速苜蓿种子的老化进程,降低其种用价值<sup>[14]</sup>。种子萌发早期阶段是种子快速吸水、贮藏物质动员和结构损伤修复的关键阶段,因此,

研究苜蓿老化种子萌发早期的抗氧化生理和分子调控机制,对明确种子老化原因、提高种子质量、实现田间均匀出苗具有重要意义。基于此,本研究的内容是:1)探究老化处理对苜蓿种子萌发特性的影响;2)研究老化种子萌发早期抗氧化系统的生理变化规律;3)研究老化种子萌发早期抗氧化系统相关基因表达模式并挖掘响应种子老化的关键基因。本研究将增进对种子老化的抗氧化生理和分子调控机制的深入了解,对维持种子活力等相关研究具有积极的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本研究以‘中苜1号’紫花苜蓿(*M. sativa* ‘Zhongmu No. 1’)种子为试验材料,2019年收获于酒泉大业种业公司。筛选出大小均一,颗粒饱满的种子置于4℃冰箱备用。试验前测定含水量为5%,发芽率为95%,硬实率为4%。

### 1.2 种子老化处理

按照Xia等<sup>[15]</sup>研究中所用的方法对苜蓿种子进行老化处理。首先,将含水量已调整至10%的苜蓿种子密封于铝箔袋中(0.12 m×0.17 m,每袋约40 g),并置于45℃水浴中。老化10 d后将老化种子全部取出并放置室温进行平衡。将未老化和老化10 d苜蓿种子分别标记为CK和Aged,随后进行种子发芽特性和抗氧化生理和基因表达量等相关分析。

### 1.3 种子发芽参数测定

苜蓿种子发芽参数测定按照国际种子检验协会(International Seed Testing Association, ISTA)种子检验规程<sup>[16]</sup>规定的发芽方法进行。每个培养皿(12 cm×12 cm)放置3层滤纸并加入蒸馏水10 mL。CK和Age处理分别设4次重复,每个重复100粒种子,随后将培养皿放于温度20℃,光照8 h/黑暗16 h的光照培养箱中培养。培养期间每隔24 h统计胚根突破种皮2 mm的种子数,用于计算平均发芽时间(mean germination time, MGT)、发芽指数(germination index, GI)和活力指数(vigor index, VI),计算公式如下:

$$MGT = \sum(NT) / \sum N$$

$$GI = \sum N / T$$

$$VI = GI \times FW_{10}$$

式中: $T$ 是发芽天数, $N$ 是第 $T$ 天的发芽种子数, $\sum N$ 是总发芽种子数, $FW_{10}$ 是第10天种苗鲜重。

第4天初次计数和第10天末次计数时统计正常种苗数,并在每个处理中随机选取20株正常幼苗,测量幼苗苗长、根长和单株鲜重,相关指标测定参考陆皎云等<sup>[17]</sup>的方法。

### 1.4 生理指标测定

CK和Aged种子分别吸胀12 h后全部收集到研钵中,加入液氮后迅速研磨成粉末,转移至15 mL离心管中并暂存于-80℃冰箱,用于丙二醛(malondialdehyde, MDA)和 $H_2O_2$ 含量、抗氧化酶活性和抗氧化剂含量测定。

**1.4.1 MDA和 $H_2O_2$ 含量测定** MDA含量采用硫代巴比妥酸法测定<sup>[18]</sup>。将样品在5%(w/v)三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)中均质化,并与等体积的0.5%硫代巴比妥酸混合,将该混合物在95℃下孵育30 min,然后在15168  $r \cdot \min^{-1}$ 下离心20 min,测量532和600 nm处的吸光度以计算MDA含量。

$H_2O_2$ 含量测定参考Kurek等<sup>[19]</sup>的方法,具体是将样品在0.1%(w/v) TCA中均质化,在8500  $r \cdot \min^{-1}$ 下离心15 min,然后将0.5 mL上清液与10 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲液(pH 7.0)和1 mL 1 mol·L<sup>-1</sup> KI混合,通过测量390 nm处吸光度值以计算 $H_2O_2$ 含量。

**1.4.2 抗氧化酶活性测定** 取0.2 g样品粉末,加入对应体积缓冲液[50 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲液,pH 7.0,含1.0 mmol·L<sup>-1</sup> 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)和1%聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone, PVP)],进行均质化处理以提取相关蛋白。在4℃下以8500  $r \cdot \min^{-1}$ 离心20 min后,将上清液用于酶活性测定<sup>[20]</sup>。通过对硝基蓝四唑光化学还原的抑制来测量SOD活性,其中50%的抑制定义为一个酶单位<sup>[19]</sup>。通过 $H_2O_2$ 降解导致的240 nm处吸光度的降低来评估CAT活性<sup>[17]</sup>。使用愈创木酚和过氧化氢底物测定POD活

性,测量 470 nm 处的吸光度<sup>[19]</sup>。GR 活性通过 NADPH 氧化引起的 340 nm 吸光度下降来测定,MDHAR 活性通过 340 nm NADH 氧化来测定,APX 活性通过 AsA 消耗引起的 290 nm 吸光度下降来测定,DHAR 活性通过 265 nm 吸光度增加来测定<sup>[17]</sup>。蛋白质浓度采用 Bradford 法测定<sup>[21]</sup>。

**1.4.3 抗氧化剂含量测定** 分别使用从苏州科铭生物科技有限公司采购的 ASA-2A-W、DHA-2-W、GSH-2-W 和 GSSG-2-W 商业检测试剂盒测定 AsA、DHA、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (glutathione oxidized, GSSG) 含量。所有测定均按照试剂盒说明书 (<http://www.cominbio.com/>) 进行。将 0.1 g 样品提取到 1 mL 相应的提取溶液中,用乙酸溶液提取 AsA,用偏磷酸溶液提取 DHA、GSH 和 GSSG。AsA 含量通过其与 Fast Blue B 盐的反应来确定,在 420 nm 处测量吸光度值。DHA 含量通过用二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) 将其还原为 AsA 来测定,在 265 nm 处测量吸光度值。GSH 含量依据其在 GR 存在下被 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB] 依次氧化和被 NADPH 还原而得出,测量波长为 412 nm。使用 2-乙烯基吡啶 (2-vinylpyridine, 2VP) 作为 GSH 抑制剂来测定 GSSG 含量。

### 1.5 抗氧化系统和 ROS 代谢相关基因表达量分析

CK 和 Aged 种子吸胀 12 h 后收集种子,液氮速冻后放入  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱用于 RNA 提取。使用快速 RNA 提取试剂盒 (Huayueyang Biotech Co., Ltd., 中国) 提取总 RNA。随后,使用 SuperMix for qPCR 试剂盒 (TransGen Biotech, 中国) 进行反转录。采用 CFX96 实时荧光定量系统 (Bio-Rad, Hercules, CA, 美国) 进行 qRT-PCR 分析。以 *MsACTIN* 基因作为内参基因。qRT-PCR 循环程序包括:  $95^{\circ}\text{C}$ , 3 min, 然后进行 40 个循环,每个循环包括:  $95^{\circ}\text{C}$ , 15 s;  $60^{\circ}\text{C}$ , 30 s。使用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法分析基因的转录水平<sup>[22]</sup>。qRT-PCR 分析所用全部基因引物信息见表 1。

### 1.6 数据统计和分析

使用 SPSS Statistics 22.0 进行统计分析,采用方差分析和 Duncan 检验法确定老化处理之间的显著差异。使用 GraphPad Prism 9.0 绘制条形图。

## 2 结果与分析

### 2.1 老化处理对苜蓿种子萌发特性的影响

从图 1 可以看出,老化处理不仅抑制了苜蓿种子萌发进程,同时显著影响了萌发后幼苗的正常生长速度。老化处理使苜蓿种子发芽率从最初的 95% 降至 70%,种子平均发芽时间也显著 ( $P < 0.05$ ) 延长至 3 d,严重影响了苜蓿种子的萌发速度。同时老化种子活力指数也显著 ( $P < 0.05$ ) 下降。老化处理不仅影响到种子发芽率和发芽速度,还严重影响了苜蓿种子萌发后幼苗的生长状况。老化种子萌发 10 d 后,幼苗根长和苗长与 CK 相比,均呈显著 ( $P < 0.05$ ) 下降的趋势;老化种子萌发 10 d 后,幼苗单株鲜重与 CK 相比也显著 ( $P < 0.05$ ) 下降。

### 2.2 老化处理对苜蓿种子抗氧化酶活性的影响

由图 2 可知,与 CK 相比,老化苜蓿种子萌发早期  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量显著升高,老化处理导致种子中  $\text{H}_2\text{O}_2$  积累。MDA 是膜质过氧化产物,其含量的高低可以反映细胞或者细胞器膜质氧化损伤程度。本研究发现,老化种子中 MDA 含量显著 ( $P < 0.05$ ) 高于 CK 种子。老化种子萌发早期 SOD、CAT、APX、DHAR 和 MDHAR 活性显著 ( $P < 0.05$ ) 高于 CK 种子,其中 CAT、APX、DHAR 和 MDHAR 活性极显著 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ) 升高。与 CK 相比,老化苜蓿种子萌发早期 POD 和 GR 活性极显著 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ) 降低。

### 2.3 老化处理对苜蓿种子抗氧化物含量的影响

AsA 和 GSH 在种子萌发早期的作用非常重要,它们作为主要的抗氧化物质参与调节种子萌发过程中的氧化还原反应、细胞信号传递以及植物的生长发育。由图 3 可知,与 CK 相比,老化苜蓿种子萌发早期 AsA 和 GSH 含量显著 ( $P < 0.05$ ) 降低。DHA 和 GSSG 分别是 AsA 和 GSH 在抗氧化反应中失去一个电子后形成的氧化产物,其含量的高低在一定程度上也能反映此时细胞的抗氧化能力。与 CK 相比,DHA 和 GSSG 含量在老化苜蓿种子萌发早期呈升高的趋势,但与 CK 未达到显著差异。

表 1 qRT-PCR 分析引物信息

Table 1 Primers for qRT-PCR analysis

编号 No.	基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	产物大小 Product size (bp)	溶解温度 Melting temperature (°C)
1	<i>MsCAT1</i>	F: ACAGGGATGAGGAGGTGAACTAC R: CGCTGGATGAAACGGTCTTGC	130	63.6 63.3
2	<i>MsPOD12</i>	F: CCAAGGCAGAGTCCATCGTG R: CCGTCCAGGAGCACTGAAGC	102	60.0 59.8
3	<i>MsAPX</i>	F: AAGGACTATGCTGAATCACACAAG R: CAACTGCTACGCCGACTGC	111	56.9 58.5
4	<i>MsDHAR</i>	F: AAGACCAAGCCAGCCAAGGAG R: AAGGACAGGACAGAACACAGACG	96	60.2 60.9
5	<i>MsCu/Zn-SOD</i>	F: ACCGCCGTGACAGGAAGC R: GCAACACCATCCGCTCCAG	85	60.7 60.5
6	<i>MsFe-SOD</i>	F: AGAAGCACCACGCCACCTAC R: CGCCGCCGTTGAACTTGATG	112	59.1 59.8
7	<i>MsMn-SOD</i>	F: GCTGATGTGCTTGAATCCTTGAAC R: GTGCTTGTGCTGGTGAACCTCC	147	59.7 59.0
8	<i>MsGR1</i>	F: AGAACAGCATATCCAAACGACAG R: CAGCCTTGAGTGCGACAGC	133	60.0 59.7
9	<i>MsAOX1c</i>	F: GCTGGAGGAGGCGGAGAAC R: TCGGTGTAGGAGTGATGGC	96	58.4 56.5
10	<i>MsNAC67</i>	F: TGCCAAGCCTGCCCTGATATG R: ATTATTGTTGCCACCTCGTTTCC	142	58.8 59.7
11	<i>MsNAC74</i>	F: CCGCCTTGCCGACACCTC R: TCTTCTCCATTCGTTCTTCTTGC	101	58.6 59.9
12	<i>MsNAC83</i>	F: CGGAAGGCTGGGTGCTCTG R: TCGTGGACGGATCTTCTTGG	124	60.3 60.1
13	<i>MsACTIN</i>	F: CAAAAGATGGCAGATGCTGAGGAT R: CATGACACCAGTATGACGAGGTCG	88	59.4 59.5

#### 2.4 老化处理对苜蓿种子抗氧化系统和 ROS 代谢相关基因表达量的影响

为了进一步从分子水平揭示老化苜蓿种子萌发速度变慢的原因,分析了老化处理对苜蓿种子抗氧化系统和 ROS 代谢相关基因表达量的影响,对活性氧清除和代谢相关基因的表达量进行了测定。从图 4 中可以看出,与 CK 相比,老化种子萌发早期 *MsCAT1*、*MsPOD12* 和 *MsDHAR* 表达量显著 ( $P < 0.05$ ) 降低; *MsCu/Zn-SOD*、*MsFe-SOD* 和 *MsMn-SOD* 表达量在老化种子中与 CK 相比均下降,且 *MsFe-SOD* 和 *MsMn-SOD* 下降显著 ( $P < 0.05$ )。 *MsGR1* 表达量在老化种子中也显著 ( $P < 0.05$ ) 下降。 *AOX1c* 是一种植物中存在的抗坏血酸氧化酶 (ascorbate oxidase, AO) 基因的亚型。抗坏血酸氧化酶是一个重要的酶,负责催化 AsA 的氧化反应,即将 AsA 氧化为其产物 DHA。本研究发现, *MsAOX1c* 表达量在老化种子萌发早期显著 ( $P < 0.05$ ) 升高。 NAC 转录因子 (NAC transcription factors) 是植物中一个重要的转录因子家族,广泛参与植物的生长、发育、应激反应等多种生理过程。本研究根据已报道的 *NAC67*、*NAC74* 和 *NAC83* 参与种子活力调控,分析了其在老化种子萌发早期表达量的变化。从图 4 可以看出,与 CK 相比, *MsNAC67*、*MsNAC74* 和 *MsNAC83* 表达量在老化种子中均显著 ( $P < 0.05$ ) 升高,老化处理显著诱导了其表达。

#### 2.5 老化苜蓿种子萌发早期抗氧化系统生理代谢和基因表达规律

依据老化种子萌发特性、抗氧化酶活性和抗氧化剂含量的变化以及抗氧化系统和 ROS 代谢相关基因的表达

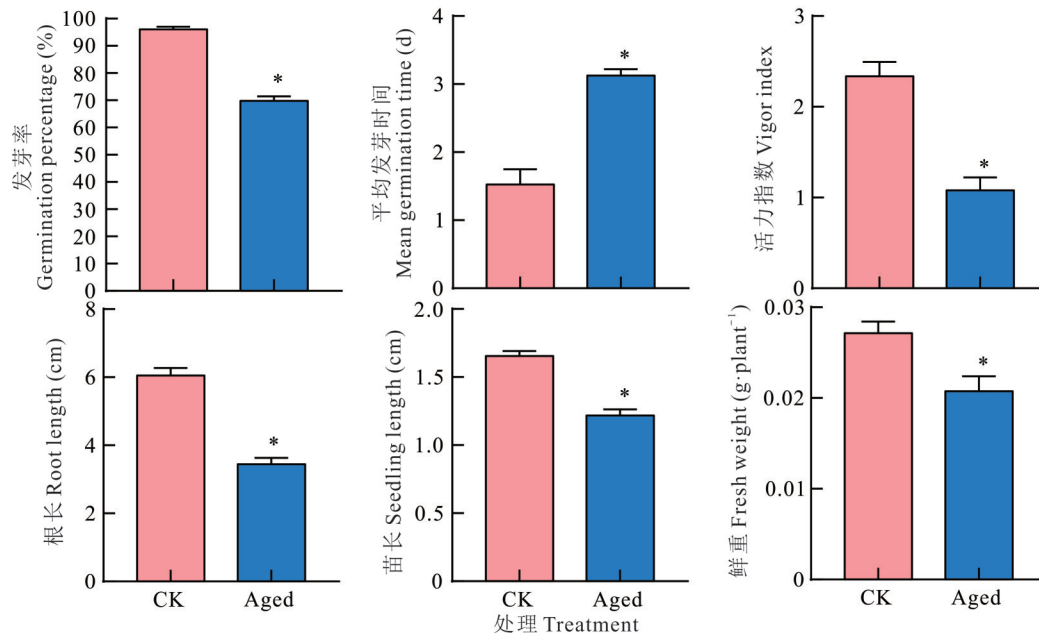


图1 老化苜蓿种子萌发特性的变化

Fig. 1 Changes in germination related indicators of aged alfalfa seeds

\*表示在 0.05 水平下差异显著 \* indicate significant differences at the 0.05 level. CK: 未老化 Unaged; Aged: 老化 10 d Aged 10 days. 下同 The same below.

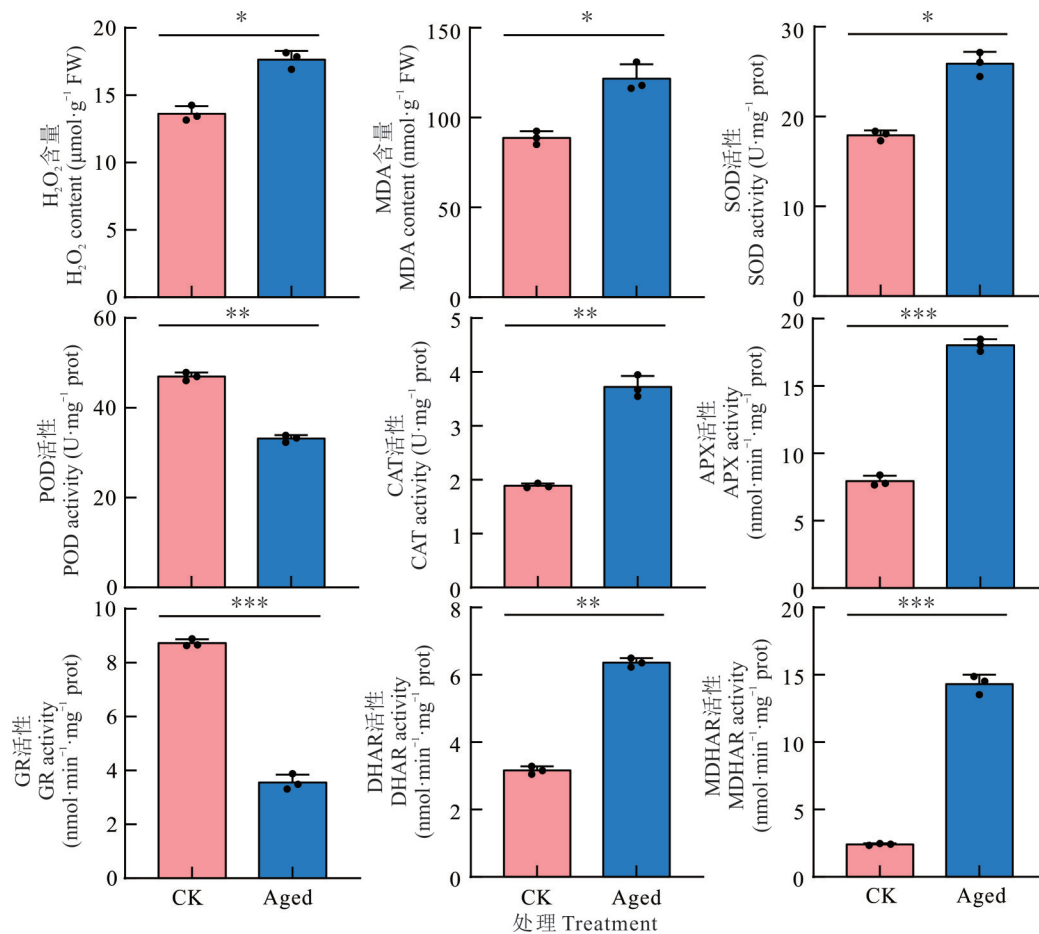


图2 老化苜蓿种子萌发早期抗氧化酶活性的变化

Fig. 2 Changes in antioxidant enzyme activities during the early germination stage of aged alfalfa seeds

\*\* :  $P < 0.01$ ; \*\*\* :  $P < 0.001$ . 下同 The same below.

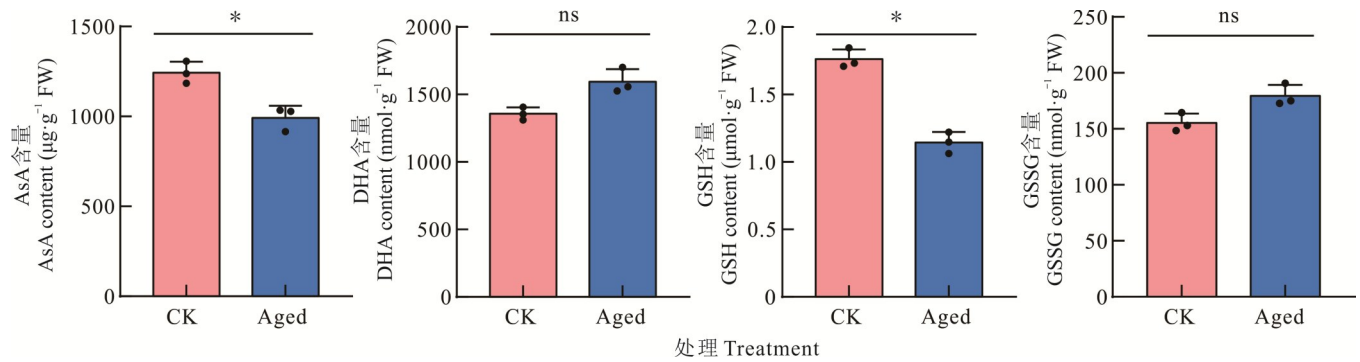


图 3 老化苜蓿种子萌发早期抗氧化物含量的变化

Fig. 3 Changes in antioxidant content during the early germination stage of aged alfalfa seeds

ns 表示无显著差异。ns indicate no significant differences.

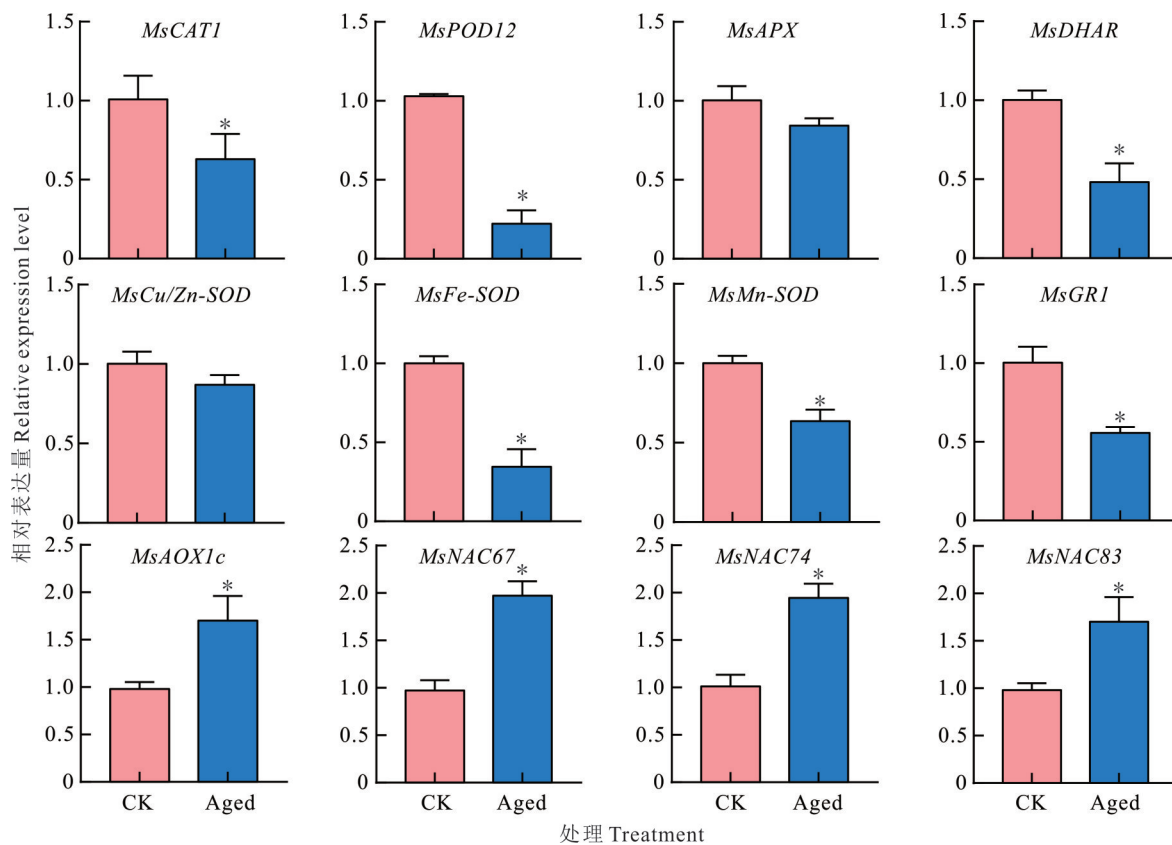


图 4 老化苜蓿种子抗氧化系统和 ROS 代谢相关基因表达量的变化

Fig. 4 Changes in the expression levels of genes related to the antioxidant system and ROS metabolism of aged alfalfa seeds

量变化,绘制了苜蓿种子萌发早期响应老化胁迫示意图(图5)。老化处理不仅抑制了苜蓿种子萌发进程,同时显著影响了萌发后幼苗的正常生长速度,导致萌发后期幼苗变小。老化处理也严重影响了ROS的代谢, $H_2O_2$ 产生速率大于清除速率,导致老化种子萌发早期 $H_2O_2$ 含量升高。抗氧化酶POD和GR的活性显著降低。此外,抗氧化物AsA和GSH含量也极显著降低。抗氧化酶活性和抗氧化物含量的显著降低使得细胞的抗氧化能力下降。老化处理不仅影响了抗氧化生理的变化,还抑制了抗氧化代谢相关基因的表达。本研究发现,老化处理显著抑制了*MsCAT1*、*MsPOD12*、*MsDHAR*、*MsGR1*、*MsFe-SOD*和*MsMn-SOD*的表达;诱导了*MsAOX1c*、*MsNAC67*、*MsNAC74*和*MsNAC83*的表达。从响应模式中可以看出,老化处理导致苜蓿种子抗氧化能力降低, $H_2O_2$ 的积累抑制了苜蓿种子正常萌发进程。

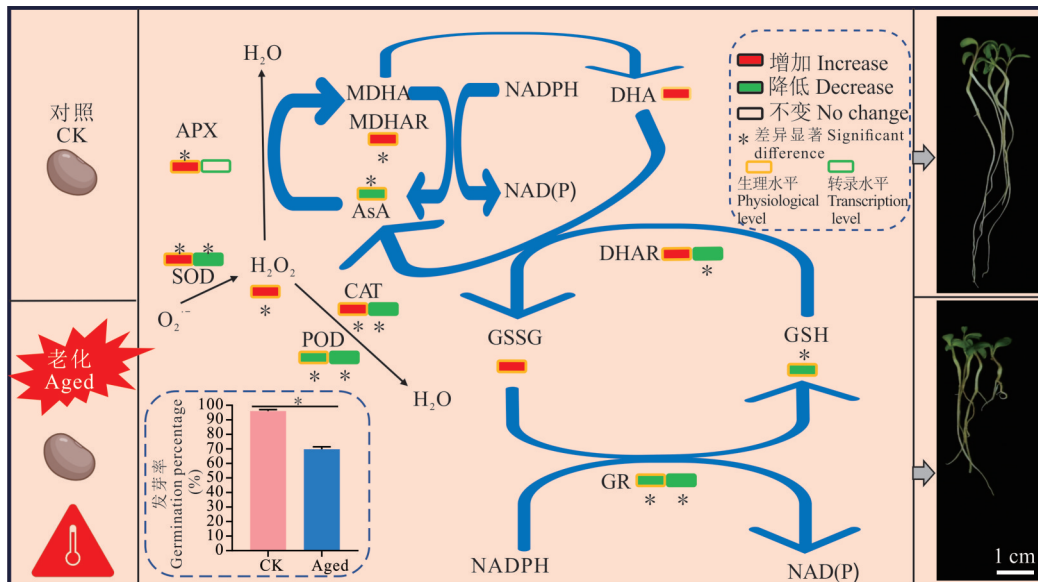


图5 苜蓿种子抗氧化系统对老化处理的响应示意图

Fig. 5 Schematic diagram of the response of the antioxidant system in alfalfa seeds to ageing treatments

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 过氧化氢 Hydrogen peroxide; O<sub>2</sub><sup>-</sup>: 超氧阴离子 Superoxide anion; SOD: 超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase; CAT: 过氧化氢酶 Catalase; POD: 过氧化物酶 Peroxidase; APX: 抗坏血酸过氧化物酶 Ascorbate peroxidase; GR: 谷胱甘肽还原酶 Glutathione reductase; DHAR: 去氢抗坏血酸还原酶 Dehydroascorbate reductase; MDHAR: 单脱氢抗坏血酸还原酶 Monodehydroascorbate reductase; AsA: 抗坏血酸 Ascorbic acid; DHA: 去氢抗坏血酸 Dehydroascorbic acid; GSH: 谷胱甘肽 Glutathione; GSSG: 氧化型谷胱甘肽 Glutathione oxidized; NADPH: 还原型辅酶 II Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; MDHA: 单脱氢抗坏血酸 Monodehydroascorbic acid; NADPH: 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

### 3 讨论

#### 3.1 老化处理对紫花苜蓿种子萌发特性和幼苗生长的影响

具有高活力的种子通常在萌发和萌发后期幼苗生长中表现出显著的优势。在多项研究中发现,人工老化处理会导致种子发芽率、发芽势、发芽指数和活力指数均下降。本研究发现,苜蓿种子老化 10 d 后,发芽率显著下降,从最初的 95% 下降至 70%。类似的结果也出现在燕麦 (*Avena sativa*) 种子中,种子发芽率在老化 24 d 后迅速下降<sup>[19]</sup>。此外,老化苜蓿种子表现出平均萌发时间显著增加,这与对老化的红杉 (*Metasequoia glyptostroboides*) 种子在短期人工老化处理后的研究结果一致<sup>[17]</sup>。总体而言,老化处理导致了苜蓿种子活力的降低,表现为发芽率降低、种子萌发速度也显著降低、正常幼苗数量减少、幼苗苗长和根长缩短。

#### 3.2 老化处理对苜蓿种子抗氧化酶活性和抗氧化物含量的影响

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为植物体内的一种活性氧,广泛地参与各种生命活动。研究发现低浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在种子萌发阶段发挥重要作用<sup>[23]</sup>。AsA-GSH 循环中的 GR、APX、DHAR 和 MDHAR,以及 SOD、POD、CAT 共同组成了植物体内的抗氧化系统,有效清除细胞体内活性氧,维持细胞代谢稳定以及结构完整,显著减少逆境带来的氧化损伤。然而 ROS 过多的积累会导致清除机制失衡,加速种子细胞内膜脂过氧化进程,高浓度的 ROS 会造成严重的细胞膜脂损伤,植物种子内部代谢混乱,萌发被严重阻碍<sup>[24]</sup>。种子老化是一个复杂的生理和生化过程,涉及许多反应<sup>[25]</sup>。在本研究中,老化种子萌发早期 POD 和 GR 活性均显著 ( $P < 0.05$ ) 下降。这可能是老化苜蓿种子中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量积累增加的原因之一。老化苜蓿种子中, SOD 活性显著升高,这与对绿豆 (*Vigna radiate*) 连续老化的研究结果一致<sup>[26]</sup>。老化种子中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量显著高于未老化种子,处理之间差异显著 ( $P < 0.05$ )。CAT 在抗氧化系统中发挥着关键作用,主要清除植物细胞中的 ROS,其主要功能是清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,从而调节相关的信号通路。CAT 活性主要发生在过氧化物酶体和乙醛酸循环体中<sup>[27]</sup>。在本研究中, CAT 活性在老化种子萌发早期极显著升高。APX 活性表现出升高的趋势。MDA 是脂质过氧化的副产物,作为氧化应激的关键生物标志物,可以指示氧化胁迫下细胞

膜质损伤的程度。老化种子中MDA含量显著( $P < 0.05$ )高于CK种子,表明在种子老化过程中脂质过氧化损伤严重。AsA-GSH循环在维持膜蛋白结构稳定性方面起着重要作用<sup>[28]</sup>。本研究发现,老化处理显著抑制了AsA和GSH的合成,导致其含量呈下降的趋势。老化苜蓿种子萌发早期AsA和GSH含量极显著( $P < 0.01$ )降低,这表明老化导致种子的抗氧化能力下降。这一结果与Sun等<sup>[20]</sup>在燕麦种子老化过程的研究结果一致。

### 3.3 苜蓿种子抗氧化系统和ROS代谢相关基因对老化的响应模式

本研究发现,多种抗氧化酶活性与相关基因表达趋势不一致,这可能是受到翻译后修饰、抑制剂和激活剂以及环境变化的影响。本研究发现GR的活性以及*MsGR1*的转录丰度在老化种子中显著降低。线粒体中ROS的积累增加可能严重抑制了老化种子中*MsGR1*的表达和酶活性。此外,*GR1*被认为是拟南芥叶片衰老和种子老化的重要调节剂<sup>[29-30]</sup>。因此,推测*MsGR1*可能在很大程度上参与苜蓿种子活力的调节。本研究也发现,*MsDHAR*表达量在老化种子中显著下降。多项研究已经揭示了MDHAR在种子老化后基因表达和酶活性的显著响应<sup>[16,31]</sup>,但MDHAR在种子寿命中的作用仍不清楚。然而,DHAR1是3个DHAR成员之一,在AsA-GSH循环中作用于AsA再生,已通过全基因组关联分析在拟南芥中发现,*Mn-SOD*突变体表现出较短的种子寿命<sup>[10,32]</sup>。此外,作为一种线粒体酶,*Mn-SOD*在老化苜蓿种子中也被诱导。因此可以看出,抗氧化防御基因在线粒体保护中发挥作用可能是苜蓿种子寿命的重要影响因素之一。

## 4 结论

本研究探讨了老化苜蓿种子萌发延迟的生理和分子机制,并挖掘了抗氧化系统中潜在响应种子老化的关键基因。老化处理不仅抑制了苜蓿种子萌发进程,同时显著影响了萌发后幼苗的正常生长速度。老化处理使得细胞抗氧化能力显著降低,导致ROS代谢异常、ROS平衡的破坏,从而加剧了种子老化。老化处理也显著抑制了抗氧化系统中*MsCAT1*、*MsPOD12*、*MsDHAR*、*MsGR1*、*MsFe-SOD*和*MsMn-SOD*的表达。本研究挖掘到了氧化系统中一些关键的候选基因。这些发现为深入研究种子老化的分子调控机制提供了重要基因资源,进一步的研究能够全面阐明这些关键基因调控种子活力的精确途径。

## 参考文献 References:

- [1] TeKrony D M, Egli D B. Relationship of seed vigor to crop yield: A review. *Crop Science*, 1991, 31(3): 816–822.
- [2] Finch-Savage W E, Bassel G W. Seed vigour and crop establishment: Extending performance beyond adaptation. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(3): 567–591.
- [3] Zhou W G, Chen F F, Luo X F, *et al.* A matter of life and death: Molecular, physiological, and environmental regulation of seed longevity. *Plant, Cell & Environment*, 2020, 43(2): 293–302.
- [4] Aken O V. Mitochondrial redox systems as central hubs in plant metabolism and signalling. *Plant Physiology*, 2021, 186(1): 36–52.
- [5] Bailly C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 2007, 14(2): 93–107.
- [6] Mignolet-Spruyt L, Xu E, Idanheimo N, *et al.* Spreading the news: Subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(13): 3831–3844.
- [7] Hasanuzzaman M, Bhuyan M, Anee T I, *et al.* Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants*, 2019, 8(9): 384.
- [8] Brand K A, Hermfisse U. Aerobic glycolysis by proliferating cells: A protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB Journal*, 1997, 11(5): 388–395.
- [9] Nietzel T, Mostertz J, Ruberti C, *et al.* Redox-mediated kick-start of mitochondrial energy metabolism drives resource-efficient seed germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 117(1): 741–751.
- [10] Renard J, Ninoles R, Martinez-Almonacid I, *et al.* Identification of novel seed longevity genes related to oxidative stress and seed coat by genome-wide association studies and reverse genetics. *Plant, Cell & Environment*, 2020, 43(10): 2523–2539.
- [11] Lee Y P, Baek K H, Lee H S, *et al.* Tobacco seeds simultaneously over-expressing Cu/Zn-superoxide dismutase and ascorbate peroxidase display enhanced seed longevity and germination rates under stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(9): 2499–2506.

- [12] Nigam M, Mishra A P, Salehi B, *et al.* Accelerated aging induces physiological and biochemical changes in tomato seeds involving MAPK pathways. *Scientia Horticulturae*, 2019, 248: 20–28.
- [13] Xue F, Gao B, Qiao G H, *et al.* Analysis of the differences in green farming behavior of operating agents in grassland pastoral areas. *Frontiers in Environmental Science*, 2023, 11: 1109430.
- [14] Song X Q, Yang Z R, Zhang D, *et al.* Proteomic analysis of the effect of accelerated ageing on *Allium mongolicum* seeds. *Horticulturae*, 2023, 9(10): 9101155.
- [15] Xia F S, Cheng H, Chen L L, *et al.* Influence of exogenous ascorbic acid and glutathione priming on mitochondrial structural and functional systems to alleviate aging damage in oat seeds. *BMC Plant Biology*, 2020, 20: 1–11.
- [16] Milivojević M, Ripka Z, Petrović T. ISTA rules changes in seed germination testing at the beginning of the 21st century. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 2018, 22(1): 40–45.
- [17] Lu J Y, Tian H, Zhang H S, *et al.* Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> immersion on seed germination and seedling growth of alfalfa under salt stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2023, 32(10): 141–152.  
陆姣云, 田宏, 张鹤山, 等. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浸种对盐胁迫下紫花苜蓿种子萌发和幼苗生长的影响. *草业学报*, 2023, 32(10): 141–152.
- [18] Luo Y J, Zhang Y X, Le J Y, *et al.* Full-length transcriptome sequencing reveals the molecular mechanism of *Metasequoia glyptostroboides* seed responding to aging. *Antioxidants*, 2023, 12(7): 1353.
- [19] Kurek K, Plitta-Michalak B, Ratajczak E. Reactive oxygen species as potential drivers of the seed aging process. *Plants*, 2019, 8(6): 174.
- [20] Sun M, Sun S J, Mao C L, *et al.* Dynamic responses of antioxidant and glyoxalase systems to seed aging based on full-length transcriptome in oat (*Avena sativa* L.). *Antioxidants*, 2022, 11(2): 395.
- [21] Gu J W, Hou D L, Li Y H, *et al.* Integration of proteomic and genomic approaches to dissect seed germination vigor in *Brassica napus* seeds differing in oil content. *BMC Plant Biology*, 2019, 19: 1–20.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [23] Bailly C, Benamar A, Corbineau F, *et al.* Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Plant Physiology*, 1996, 97(1): 104–110.
- [24] Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 2000, 151(1): 59–66.
- [25] Ratajczak E, Małecka A, Ciereszko I, *et al.* Mitochondria are important determinants of the aging of seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(7): 1568.
- [26] Nigam M, Singh N, Ranjan V, *et al.* Centchroman mediated apoptosis involves crosstalk between extrinsic/intrinsic pathways and oxidative regulation. *Life Sciences*, 2010, 87(23): 750–758.
- [27] Ratajczak E, Małecka A, Bagniewska-Zadworna A, *et al.* The production, localization and spreading of reactive oxygen species contributes to the low vitality of long-term stored common beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 174: 147–156.
- [28] Li J, Lei B, Zhai M H, *et al.* Study on the response mechanism of the AsA-GSH cycle in cotton seedling under low temperature stress. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2021, 35(1): 221–228.
- [29] Sercel A J, Sturm G, Gallagher D, *et al.* Hypermetabolism and energetic constraints in mitochondrial disorders. *Nature Metabolism*, 2024, 6(2): 192–195.
- [30] Ding S H, Wang L, Yang Z P, *et al.* Decreased glutathione reductase 2 leads to early leaf senescence in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2016, 58(1): 29–47.
- [31] Manna M, Rengasamy B, Sinha A K. Revisiting the role of MAPK signalling pathway in plants and its manipulation for crop improvement. *Plant, Cell & Environment*, 2023, 46(8): 2277–2295.
- [32] Morgan M J, Lehmann M, Schwarzlander M, *et al.* Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis. *Plant Physiology*, 2008, 147(1): 101–114.