

尿石素 A 浸种对玉米种子活力和萌发的影响

王亚珂, 杜 翠, 杜圆静, 王 伟, 吴晓林

(河南农业大学生命科学学院/省部共建小麦玉米作物学国家重点实验室, 郑州 450002)

摘 要: 种子活力的高低直接影响种子萌发、幼苗生长及后期植株的产量和品质。活力低的种子通过浸种(引发)处理可提高种子活力。尿石素 A(UA)是一种可重启线粒体自噬和延长秀丽线虫寿命的天然化合物。以老化 5 d 的郑单 958 玉米种子(发芽率约为 60%)为材料, 分别用 0、0.5、2.5、5.0、25.0、50.0 和 100.0 $\mu\text{mol/L}$ 尿石素 A 浸种 12 h, 探究 UA 浸种对种子活力和萌发的影响。结果发现, 用不同浓度的 UA 浸种均不同程度地促进种子提前萌发, 提高发芽率, 增幅为 3.67% ~ 26.33%, 25 $\mu\text{mol/L}$ 尿石素 A 浸种效果最好。通过体内、体外实验分析 UA 对种胚中主要活性氧清除酶活性的影响, 发现均显著提高过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)的酶活性, 降低丙二醛(MDA)含量。用 UA 浸种可能通过提高体内活性氧清除酶的活性, 进而增强种子的发芽能力。

关键词: 玉米; 浸种; 种子活力; 抗氧化活性

中图分类号: S513.01

文献标识码: A

Effect of Seed Soaking with Urolithin A on Seed Vigor and Germination of Maize

WANG Ya-ke, DU Cui, DU Yuan-jing, WANG Wei, WU Xiao-lin

(State Key Laboratory of Wheat and Maize Crop Science, College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The level of seed vigor directly influences seed germination, seedling growth and the yield and quality of plants. Pre-soaking(or priming) is a simple technique to improve seed vigor. Urolithin A(UA) is a natural compound that reactivates mitochondrial autophagy and prolongs the lifespan in *Caenorhabditis elegans*. In this study, maize Zhengdan958 seed aged for 5 days(germination rate of about 60%) were soaked with 0.5, 2.5, 5.0, 25.0, 50.0 and 100.0 $\mu\text{mol/L}$ UA for 12h, respectively, to explore the effect of seed soaking with UA on seed vigor and germination. The results showed that soaking with UA could promote seed germination in advance and increase the germination rate by 3.67% – 26.33%, especially the effect of 25 $\mu\text{mol/L}$ UA treatment. Antioxidation tests performed in vitro and in vivo revealed that UA obviously enhanced the activities of peroxidase(POD), catalase(CAT) and superoxide dismutase(SOD), and decreased the malondialdehyde(MDA) levels. In conclusion, the present results suggested that soaking with UA could improve seed germination ability by enhancing the activities of antioxidant enzymes.

Key words: Maize; Soaking; Seed vigor; Antioxidant activity

玉米是我国重要的粮饲兼用作物和能源作物。玉米种子在贮藏过程中极易吸湿受潮, 发生不可逆的劣变而丧失活力。种子活力的高低直接影响种子萌发、幼苗生长及后期植株的产量和品质。高活力的种子出苗早、齐、壮, 对逆境具有较强的抵抗力, 具

有明显的生长优势和潜力^[1]。随着现代农业的发展, 如何提高种子活力、增加作物产量, 已成为广泛关注的问题。

浸种预处理可提高种子活力, 促进种子发芽和幼苗生长, 已广泛用于农业生产中^[2-4]。目前, 常用的浸种剂有外源激素(如赤霉素、生长素)、聚乙二醇、过氧化氢、无机盐等^[5-8], 不同的浸种剂对不同种子具有不同的效果^[9]。尿石素 A (UA) 是一种具有抗氧化活性的天然化合物^[10], 是至今已有研究中唯一能够重启线粒体自噬的分子, 可阻止破损线粒体在细胞内恶性累积, 延长秀丽线虫的寿命, 改善老年鼠

录用日期: 2018-08-13

作者简介: 王亚珂(1992-), 女, 河南平顶山人, 硕士, 从事玉米种子蛋白质组学研究。E-mail: 754512302@qq.com

吴晓林为本文通讯作者。

E-mail: wuxiaolin@henau.edu.cn

的运动耐力^[11]。目前,对UA的研究主要集中在人和动物中,研究其抗氧化、抗炎、抗癌及调节肠道菌落等生物活性^[12-15],在植物中的研究较少。

鉴于UA可延缓秀丽线虫衰老的功效,UA作为浸种剂对玉米种子活力和萌发的影响,并通过体内、体外实验分析UA对种胚中主要抗氧化酶活性的影响。UA浸种用量少、无毒、无污染、效果显著,可为种子浸种技术在玉米生产中的应用提供新线索。

1 材料与方法

1.1 供试材料

挑选大小、形状、成熟度一致的郑单958玉米种子,用75%乙醇对种子表面消毒10 min,无菌水冲洗2~3次,滤纸吸干种子表面水分,于超净工作台中晾干。随机选取消毒后的种子放入老化箱中,42℃、100%相对湿度下,分别加速老化1~6 d,每份为300粒,处理结束,室温下自然风干备用。取不同老化天数的玉米种子各50粒,以不作老化处理但经消毒处理的种子作为对照,于蒸馏水中充分吸涨20 h后,胚面朝上摆放到有湿润滤纸的育苗盘中,置于25℃、相对湿度(75±5)%的人工气候箱内进行暗培养,统计每天的发芽粒数(以胚根与种子等长或胚芽长度达到种子长度的一半作为种子发芽的标准),测定发芽势、发芽率、发芽指数和活力指数。发芽势=第4天发芽的种子粒数/全部种子粒数×100%;发芽率=第7天发芽的种子粒数/全部种子粒数×100%;发芽指数(GI)= $\sum G_t/D_t$ (D_t 为发芽天数, G_t 为与 D_t 相对应天数的发芽粒数);活力指数(VI)=GI×S(GI为发芽指数,S为一定时期内玉米幼苗长度,单位为cm)。每个处理3次重复。

种子老化过度,大多数种子将丧失活力而无发芽能力;老化程度轻,将达不到实验目的,选取发芽率为60%左右的老化种子作为实验材料用于后续

研究。

1.2 实验设计

1.2.1 UA浸种处理

取老化的玉米种子350粒,分为7份,每份50粒,分别用0、0.5、2.5、5.0、25.0、50.0、100.0 μmol/L尿石素A溶液100 mL(种子全部浸没)浸种处理12 h,浸种结束后,用蒸馏水将种子快速冲洗干净,取出后室温下自然晾干。浸种处理后的干种子,以未进行浸种处理的老化种子为对照,于蒸馏水中重新吸涨20 h,放置于育苗盘中进行发芽试验,统计每天的发芽情况。每处理3次重复。

1.2.2 生理指标测定

浸种处理后的干种子和对照(未进行浸种处理),在蒸馏水中浸泡2 h以软化胚乳,手动将种胚分离开来,用于测定种胚的过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量。每个生理指标测定进行3次生物学重复。

POD活性采用愈创木酚法测定^[16];SOD活性采用氮蓝四唑法测定^[17],CAT活性采用紫外吸收法测定^[18],MDA含量采用硫代巴比妥酸法测定^[19]。

1.2.3 UA体外抗氧化活性测定

老化的玉米种子,蒸馏水中浸泡2 h,手动分离种胚,制备粗提液(依据测定指标而定),分为6等份,加入UA至终浓度分别为0、0.5、5.0、25.0、50.0、100.0 μmol/L,终体积保持相等,然后测定POD、SOD和CAT活性及MDA含量的变化。测定方法同1.2.2。每个生理指标测定3次重复。

1.3 数据处理与分析

采用Excel对数据进行初步整理,采用Graph-Pad_Prism 7.0对数据进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 试验材料筛选

表1 老化不同天数的玉米种子发芽情况
Table 1 The germination performance of maize seeds aged for different days

老化时间(d) Aging time	发芽势(%) Germinating potential	发芽率(%) Germination percentage	发芽指数 Germination index	活力指数 Vigor index
0	98 ± 1.63 a	100 ± 0.47 a	127.44 ± 1.60 a	1394.41 ± 7.95 a
1	95 ± 0.47 a	95 ± 0.47 a	124.62 ± 0.78 ab	1257.01 ± 6.64 b
2	89 ± 2.87 b	90 ± 2.05 b	120.73 ± 1.52 bc	1146.10 ± 5.75 c
3	79 ± 0.47 c	81 ± 2.36 c	108.80 ± 3.12 c	997.10 ± 6.65 d
4	68 ± 2.16 d	70 ± 2.49 d	104.60 ± 2.43 d	793.85 ± 7.45 e
5	56 ± 0.82 e	58 ± 0.94 e	63.82 ± 3.86 e	297.26 ± 7.76 f
6	50 ± 1.25 f	50 ± 1.25 f	49.74 ± 3.23 f	158.34 ± 2.77 g

注:表中不同小写字母表示在 $p<0.05$ 水平上差异显著。
Note: Different lowercase letters indicated statistically significant differences at the level of $p<0.05$.

随着老化程度的加剧,种子发芽势、发芽率、发芽指数和活力指数均呈下降趋势(表1)。老化5 d的种子,发芽率降为58%,其发芽指数和活力指数也大幅下降,差异显著。此老化程度的种子,大多数尚未完全丧失活力具有发芽能力,用于后续研究 UA 浸种对玉米种子活力和萌发的影响时,效果会比较明显。因此,后续研究均选择老化5 d的种子为实验材料,对照(CK)为未经浸种的老化5 d的种子。

2.2 UA浸种处理对玉米生理特征的影响

2.2.1 对玉米种子萌发的影响

采用0、0.5、2.5、5.0、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$ 尿石素 A 溶液浸种处理玉米种子 12 h,均不同程度促进种子提前萌发,提高发芽率,增幅为 3.67% ~ 26.33%。25.0 $\mu\text{mol/L}$ 尿石素 A 浸种后效果最佳,发芽率可达 86% (图1),表明 25.0 $\mu\text{mol/L}$ 尿石素 A 浸种 12 h 显著促进玉米种子发芽。

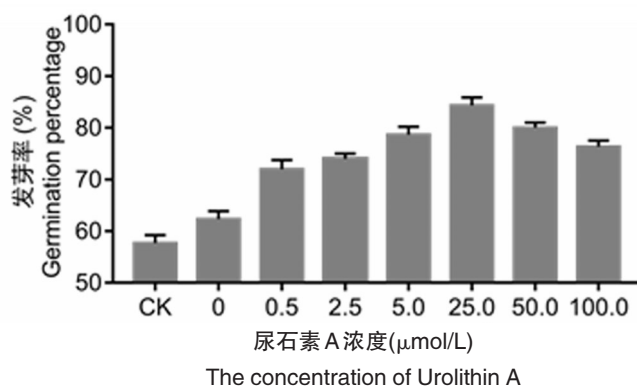


图1 不同浓度 UA 浸种对玉米种子萌发的影响

Fig.1 Effects of seed soaking with different concentrations of UA on seed germination rate of maize

2.2.2 对玉米种胚抗氧化酶活性的影响

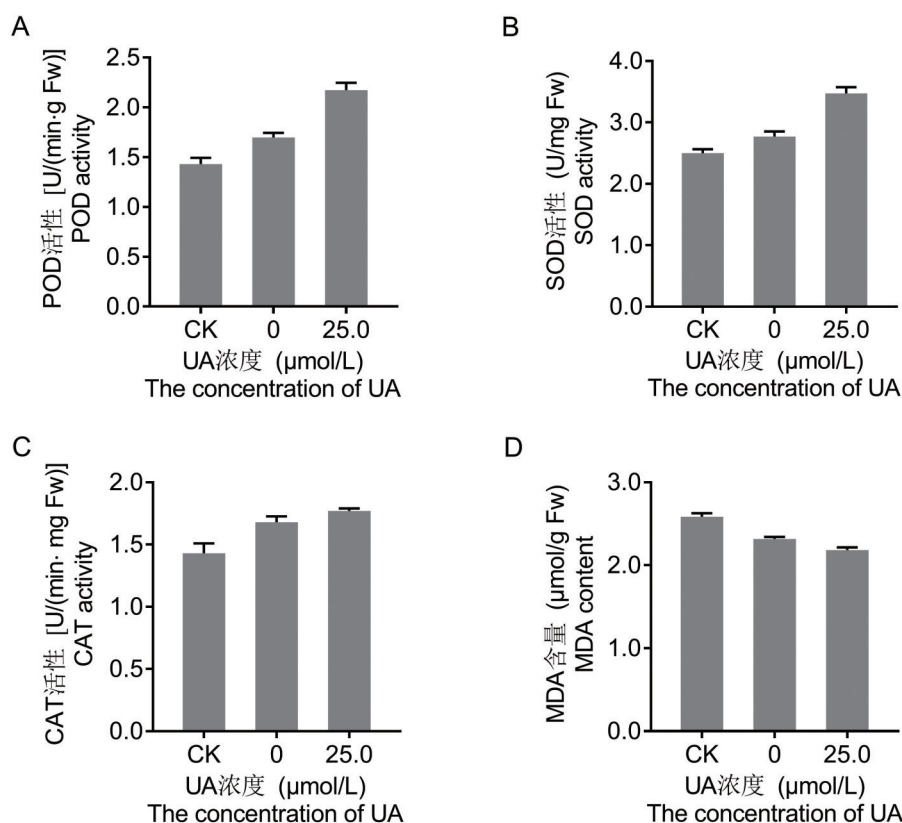


图2 UA浸种后玉米种胚抗氧化酶活性和丙二醛含量的变化

Fig.2 The changes of antioxygen enzymes activity and MDA content in maize seed embryos soaked with UA

POD、SOD和CAT是种子内抗氧化酶系统的重要组成部分,其酶活性与种子活力密切相关^[20]。用25.0 $\mu\text{mol/L}$ 尿石素A浸种12 h后,玉米种胚中POD、SOD和CAT的酶活性显著高于对照和0 $\mu\text{mol/L}$ UA浸种处理的种胚(图2),表明UA浸种处理可通过调控种胚内的抗氧化酶活性缓解种子在老化过程中受到伤害。

2.2.3 对玉米种胚脂质过氧化程度的影响

MDA含量是衡量植物细胞脂质过氧化程度的重要指标,老化的玉米种子中MDA含量较高。

25.0 $\mu\text{mol/L}$ 尿石素A浸种处理后,玉米种胚中MDA含量显著降低,效果明显优于对照和0 $\mu\text{mol/L}$ 尿石素A浸种处理,表明UA浸种处理可减轻玉米种胚的细胞脂质过氧化程度。

2.3 UA体外抗氧化活性分析

玉米种胚粗提液中加入不同浓度的UA,可不同程度提高POD、SOD、CAT活性,降低MDA含量,尤其是加入25.0和50.0 $\mu\text{mol/L}$ 尿石素A时效果最佳(图3),表明浸种期间UA可进入细胞内调控抗氧化酶的活性从而修复种子活力。

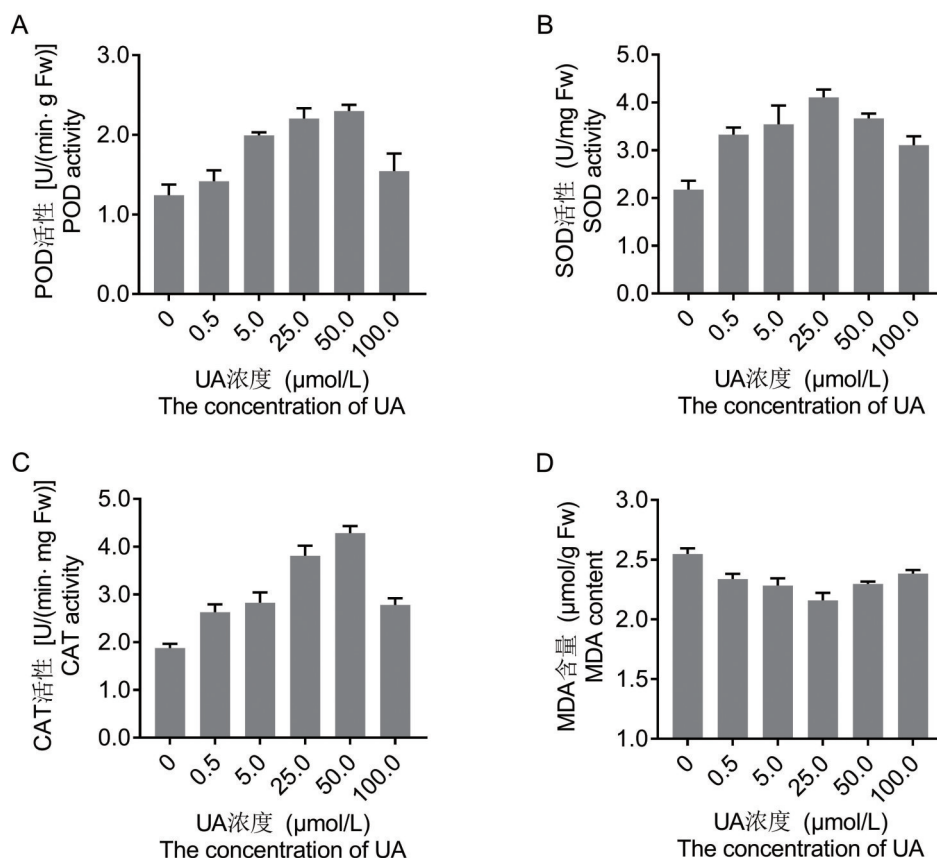


图3 UA的体外抗氧化活性测定

Fig.3 The antioxidant activity assay of UA *in vitro*

3 结论与讨论

25 $\mu\text{mol/L}$ 尿石素A溶液浸泡玉米种子12 h,可显著提高发芽率,增强POD、CAT和SOD的酶活性,降低MDA含量,其提高种子活力的机理可能是通过提高抗氧化酶的活性,修复种子老化过程中引起的膜损伤来实现。本文仅从生理生化的角度研究UA对玉米种子活力和萌发的影响,对其调控的分子机理尚需进一步研究。

种子浸种技术作为一种提高种子活力的有效措施已广泛应用于农业生产中。本文首次利用UA作

为浸种剂处理玉米种子,发现可显著促进种子萌发,提高萌发率,增强POD、CAT和SOD等抗氧化酶的活性,降低MDA含量。

种子活力在生理成熟期最高,然后逐步下降。种子在贮存过程中,不可避免地伴随着活力下降。普遍认为,种子细胞内活性氧(ROS)积累是导致种子活力下降的最主要原因,随着种子活力的降低而增加^[21, 22]。ROS可攻击蛋白质、脂类、碳水化合物和DNA等生物大分子造成氧化损害,同时积累有毒的劣变产物(MDA、脂质过氧化物等),最终可导致细胞死亡^[23, 24]。种子中存在酶促抗氧化系统和非酶促抗

氧化系统,共同协作使细胞内 ROS 的产生与清除维持在一个正常范围,保持一种动态平衡^[25,26]。其中,酶促抗氧化系统主要包括 POD、CAT、SOD 等抗氧化酶,随着种子活力的下降,POD、CAT 和 SOD 等抗氧化酶的活性也会随之降低^[27~29]。

浸种处理可提高种子活力、促进萌发,与增强种子中 POD、CAT 和 SOD 等抗氧化酶的活性、降低 MDA 等有毒物质的积累密切相关。UA 具有一定的抗氧化活性,适当浓度的 UA 浸种或体外添加 UA 均可增强 POD、CAT 和 SOD 等抗氧化酶的活性,加速 ROS 自由基的清除,降低膜脂氧化产物 MDA 含量。

参考文献:

- [1] Kruse M. Application of the normal distribution for testing the potential of the controlled deterioration test[J]. *Crop Science*, 1999, 39(4): 1125–1129.
- [2] McDonald M B. Seed priming. In: Black M, Bewley J D, (eds). seed technology and its biological basis[M]. Sheffield, England: Sheffield Academic Press, 2000.
- [3] Beckers G J, Conrath U. Priming for stress resistance: from the lab to the field[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(4): 425–431.
- [4] Farooq M, Aziz T, Rehman H U, et al. Evaluating surface drying and re-drying for wheat seed priming with polyamines: effects on emergence, early seedling growth and starch metabolism[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2011, 33(5): 1707–1713.
- [5] Tian Y, Guan B, Zhou D, et al. Responses of seed germination, seedling growth, and seed yield traits to seed pretreatment in maize(*Zea mays* L.)[J]. *The Scientific World Journal*, 2014: 834630.
- [6] Iqbal M, Ashraf M. Seed treatment with auxins modulates growth and ion partitioning in salt-stressed wheat plants[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007, 49(7): 1003–1015.
- [7] Amooaghaie R, Tabatabaie F. Osmopriming-induced salt tolerance during seed germination of alfalfa most likely mediates through H₂O₂ signaling and upregulation of heme oxygenase[J]. *Protoplasma*, 2017, 254(4): 1791–1803.
- [8] Farooq S, Hussain M, Jabran K, et al. Osmopriming with CaCl₂ improves wheat(*Triticum aestivum* L.) production under water-limited environments[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2017, 24 (15): 13638–13649.
- [9] Adegboyi E, Cooper S R, Don R. Osmotic priming of some herbage grass seed using polyethylene glycol (PEG)[J]. *Seed Science and Technology*, 1981, 9(3): 867–878.
- [10] Bialonska D, Kasimsetty S G, Khan S I, et al. Urolithins, intestinal microbial metabolites of pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, 57(21): 10181–10186.
- [11] Ryu D, Mouchiroud L, Andreux P A, et al. Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents[J]. *Nature Medicine*. 2016, 22(8): 879–888.
- [12] Wang Y, Qiu Z, Zhou B, et al. In vitro antiproliferative and antioxidant effects of urolithin A, the colonic metabolite of ellagic acid, on hepatocellular carcinomas HepG2 cells[J]. *Toxicology in Vitro*, 2015, 29(5): 1107–1115.
- [13] Zhang W, Chen J H, Aguilera-Barrantes I, et al. Urolithin A suppresses the proliferation of endometrial cancer cells by mediating estrogen receptor- α -dependent gene expression[J]. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2016, 60(11): 2387–2395.
- [14] Guada M, Ganugula R, Vadhanam M, et al. Urolithin A mitigates cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting renal inflammation and apoptosis in an experimental rat model[J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2017, 363(1): 58–65.
- [15] Boakye Y D, Groyer L, Heiss E H. An increased autophagic flux contributes to the anti-inflammatory potential of urolithin A in macrophages[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2018, 1862(1): 61–70.
- [16] 李合生, 孙 群, 赵世杰, 等. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [17] 王学奎, 黄见良. 植物生理生化实验原理与技术(第3版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2015.
- [18] 郝再彬, 苍 晶, 徐 仲. 植物生理学实验[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2004.
- [19] 刘家尧, 刘 新. 植物生理学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010.
- [20] Wu X L, Liu H Y, Wang W, et al. Proteomic analysis of seed viability in maize[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2011, 33(1): 181–191.
- [21] Parkhey S, Naithani S C, Keshavkant S. ROS production and lipid catabolism in desiccating *Shorea robusta* seeds during aging[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 57: 261–267.
- [22] Ratajczak E, Małeczka 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[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 174: 147–156.
- [23] 宋松泉, 程红焱, 姜孝成, 等. 种子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [24] Gill S S, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48(12): 909–930.
- [25] Möller I M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2001, 52: 561–591.
- [26] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 373–399.
- [27] Goel A, Goel A K, Sheoran I S. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2003, 160(9): 1093–1100.
- [28] Yin G, Xin X, Song C, et al. Activity levels and expression of antioxidant enzymes in the ascorbate-glutathione cycle in artificially aged rice seed[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 80: 1–9.
- [29] Kong L, Huo H, Mao P. Antioxidant response and related gene expression in aged oat seed[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 158.

(责任编辑:姜媛媛)