DOI: 10.5846/stxb201502040289
刘娟,归静,高伟,马俊峰,王佺珍.种子老化的生理生化与分子机理研究进展.生态学报,2016,36(16): - .
Liu J,Gui J,Gao W, Ma J F,Wang Q Z.Review of the physiological and biochemical reactions and molecular mechanisms of seed aging. Acta Ecologica Sinica,2016,36(16): - .

种子老化的生理生化与分子机理研究进展

刘 娟,归 静,高 伟,马俊峰,王佺珍*
西北农林科技大学动物科技学院, 杨陵 712100

摘要:种子作为植物遗传资源的有效保存体以及重要的种质创新原料,其老化或者劣变将直接导致发芽率、活力、生活力降低,抑制种胚正常发育以及幼苗生长,由此造成植物生产水平及其品质大幅下降。这也将进一步涉及因种质资源匮乏、土壤种子库系统功能紊乱所引发的全球生物多样性减小、草地退化和荒漠化加剧等生态危机问题。本文对种子老化生理生化特性和分子机理等研究进行了综述。总结了近年来关于种子老化涉及的理化反应包括保护酶活性的改变、核酸以及蛋白质的分解、内源激素的消长、质膜完整性降低等相关研究.并从蛋白代谢、核酸代谢、种子含水量以及基因重组等多角度总结和阐述了与老化机理有关的最新研究观点,以期为种子老化、种子活力修复和种子寿命延长等机理研究提供基础理论参考。目前对种子老化的研究多集中于传统的生理生化过程和内外影响因子相对独立变化的片段性研究,缺乏系统综合的多层面体系研究。种子作为生命体,随着探讨生命衰老机理的生物技术日新月异,通过蛋白组学、酶学、基因工程技术、转录组测序等新技术的应用,必将对未来种子老化机理机制的揭示有突破性推进作用。

关键词:种子;衰老;生理改变;研究进展

Review of the physiological and biochemical reactions and molecular mechanisms of seed aging

LIU juan,GUI Jing,GAO Wei, MA Junfeng,WANG Quanzhen*
College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, *China*

Abstract: Seeds undoubtedly play an essential role in the storage of germplasm resources preserved both to facilitate the preservation of rare species and genetic innovation. However, the negative effects of seed aging and deterioration on crop yield and quality, which negatively affects the germination rate, seed vigor and viability, embryo growth, and seedling emergence of future generations of seeds, has become a cause of increasing concern. In addition, problems associated with seed aging can also accelerate the loss of global biodiversity, grassland degradation, and desertification, because of the poor quality germplasm and dysfunction of the soil seed bank. This article summarizes current research on the physiological characteristics of naturally and artificially aged seeds and their various intrinsic chemical alterations, including their protective enzymatic activity, nucleic acid and protein content, endogenous hormones, and plasma membrane integrity. We also comprehensively interpret advances in research on the aging mechanism, including aspects of protein and nucleotide metabolism, seed moisture content, and genetic recombination. This work is intended to provide a theoretical reference for future exploration of seed aging, and insight into potential repair and lifespan elongation methods.1. Seed moisture content should be a focus of future studies, because the biophysical status and quantity of the water in aged seeds determines the different pathways of seed death or deterioration. Furthermore, activation of ROS (reactive oxygen species) can significantly

基金项目:国家自然科学基金(31472138)
收稿日期:2015-02-04; **网络出版日期**:2015-00-00
* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: wangquanzhen191@163.com

accelerate the aging process, particularly when seeds are hydrated, as this endows them with mobility and increases biological activity. In addition, ROS play a positive role as intracellular signaling molecules in seed germination and other physiological processes. Thus, real-time, continuous, and qualitative-quantitative analyses and monitoring of the ROS distribution in different embryo components may help to reveal the comprehensive and multiple functions of ROS during seed aging. Moreover, as mitochondria have been well established as the main organelle via which to detect ROS accumulation, detailed examination of their physiological changes before and after aging (naturally and artificially induced) may provide a more specific target for the study of PCD (Programmed Cell Death) occurring during seed aging. 2. Enzymatic or non-enzymatic reactions can result in seed aging. Thus, observing and regulating the metabolism and signal transduction pathways of biological enzymes accelerating the aging process at the proteomics, transcriptional, and gene recombination levels could be a promising strategy for future seed aging research. Relevant enzymes include PLD (Phospholipases D) and LOX (lipoxygenase). Therefore, comparing the physiological and biochemical changes, from aspects of matter and energy metabolism, redox potential, protein expression, and nucleic acid metabolism, involved in different parts of the aged seeds (hypocotyl, cotyledon, endosperm), and different periods of aging process (aged in the early, middle, late) is a necessity to gain a better understanding of aging mechanism. Nevertheless, current attention has mostly been on traditional and fragmentary reaction procedures as well as the internal and external factors that influence the aging process. Some perspective studies, which are more systematic and multidimensional, may facilitate the development of targeted research on seed aging. This in turn could prompt the development of biotechnological advances for organismal biology, the seed aging mechanism.

Key Words: seed; aging; physiological alteration; research progress

种子作为植物最主要的繁殖材料和生产资料,其品质的优劣直接影响农作物、饲草、林木等的生产、经济与遗传资源有效利用、土壤种子库稳态维持[1-8]、以及植被恢复与重建等生态价值的实现[9-10]。一般来讲,具有正常生理活性的种子能够在干燥条件下保持一定时间的活力,但是随着贮存时间的延长、贮存条件的不当、内外环境的胁迫,种子劣变老化将不可逆、不可避免地发生[11]。种子老化或者劣变是一个逐步发生并且涉及众多复杂生理生化反应的过程。这体现在伴随着膜脂过氧化,保护酶钝化,蛋白质降解,相关基因表达紊乱以及核酸降解等生理生化反应[12-14],老化过程表现出种子发芽率、生活力、质膜完整性降低,内部保护酶系统活性减弱,有毒有害物质累积等特点[15]。以往关于种子老化的研究热点主要集中于对老化的生理特性的考察,以及对种子最优活力检测条件的探讨;其中涉及老化机理的研究则是 McDonald[14]在总结前人研究基础上提出的膜脂过氧化假说,即种子内部自动氧化或在氧化酶参与下产生的自由基对细胞内的脂类物质进行氧化攻击,从而使得质膜完整性受损,老化加剧。另外,Miquel[16]等提出了衰老的线粒体学说,该学说认为,在不具备叶绿体的种子细胞内,线粒体呼吸电子传递链可能是活性氧(ROS)主要来源,而 ROS 的积累导致线粒体大分子有机物质的氧化损伤,由此加速衰老的进程。

鉴于种子在生物多样性保护、农林牧业生产和植物群落重建、演替中具有举足轻重的作用[4-10],以及老化过程的复杂性、多变性,近年来国内外关于老化的探究之路依然在曲折中前进。之前虽已有不少关于种子老化的机理探究性概述[11-16]以及涉及破除老化方法、提高种子发芽率的研究[17-18],但是对老化所涉及的理化反应(Amadori-Maillard reaction),生化过程,种子含水量与衰老途径,以及从分子生物学和基因组学等多角度解释衰老机理的综合性概述鲜有报道。由此,本文较为深入全面地总结了近年来国内外关于种子老化所涉及的活力指标变化、Amadori-Maillard 反应、膜脂过氧化作用、蛋白质以及核酸代谢过程等方面的相关研究,试图由大及小,由外至内从分子、细胞生物学以及基因组学等多层次综合分析不同观点,总结种子衰老机理研究进展。以期为种子老化、种子活力修复和延长种子寿命等机理提供基础理论依据。

1　衰老种子的生理生化特性

1.1　人工加速老化种子的特性研究

人工加速老化处理(Accelerating Aging Treatment, AAT)即通过高温高湿法加速供试种子生理生化劣变,从而更直接、迅速地考察和判定其老化特性以及最优活力检测条件[19-22]。从对花生(*Arachis hypogaea*)[19]、辣椒(*Capsicum annuum*)[20]、蒺藜豆(*Medicago ruthenica*)[21]、大豆(*Glycine max*)[22]、玉米(*Zea mays*)[23]、甜辣椒(*Capsicum annuum*)[24]、芝麻(*Sesamum indicum*)[25]、垂穗披碱草(*Elymus nutans*)[26]和黑麦草(*Lolium perenne*)[27]等,人工加速老化处理的研究中,一致的结果表明老化种子的发芽势、发芽率、发芽指数、活力指数,相关保护酶活力均随老化时间的延长,整体呈下降趋势;种子浸出液电导率、膜脂过氧化产物—丙二醛(MDA)含量和可溶性糖含量均随老化时间的延长而升高,与种子的各项活力指标呈负相关。由此可知,伴随老化程度的加深(AAT 处理),种子内部涉及复杂的物质能量代谢变化以及生理生化劣变,而这些代谢产物有可能进一步作用于老化种子,加速其劣变,由此导致其活力的降低并直接抑制发芽。另外,通过考察人工老化处理过程中种子特定生理指标的变化,种子活力的检测与评价也得以实现,如:种子浸出液用来体现二行芥(*Diplotaxis muralis*)[28]老化种子活力,而四氮唑还原强度则适用于大麦(*Hordeum vulgare*)[29]种子评价。因此,对于种子活力的评价并不局限于单个、特定的老化生理指标变化趋势,而与具体物种的植物学特征(单双子叶)、种皮透性、养料贮存部位等因素有关。虽然大量的研究表明 AAT 处理能较为迅速直接地达到种子老化检测目的、探讨老化最佳检测条件(温度,湿度,时间),但是该方法的反应其实验过程过于激烈,所涉及到的老化细节难以全局把握[30]。因此,在 AAT 处理过程中加入适量的饱和 NaCl 溶液会显著降低种子强烈的吸水性,从而使得人工加速老化过程进行得更为缓和,试验干扰因素也因此降低[30-31]。另外,相比传统人工高温高湿老化处理条件而言,利用分压为 18 Mpa 的氧气处理干燥贮存条件下的种子,同样可以达到加速老化的目的,而且方法更为快捷,尤其适用于对干燥种子老化的生理生化特性研究[32]。

1.2　老化种子的酶活性、激素变化

不论是人工老化还是自然老化,草本和木本植物种子老化的生理特性均表现出一致性:衰老种子在死亡之前,其内部将发生一系列的生理生化反应,如保护酶活性的改变,内源激素的涨落,核酸以及蛋白质的降解,质膜结构不可逆地受损等等。人工老化毛竹(*Phyllostachys edulis*)[33]和欧洲赤松(*Pinus sylvestris*)[34]种子活力的降低与细胞膜的完整性降低具有显著相关性,研究者推测 MDA 将结合过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)等保护酶,致使保护酶空间构象改变,导致自由基累积而促成膜脂发生过氧化。此外,随老化程度的加深,供试毛竹种子还表现出赤霉素(GA),生长素(IAA)含量降低,而脱落酸(ABA)含量增加[33]。然而,关于 GA 对老化种子萌发力的显著促进作用也早在芝麻[35]和秋葵(*Abelmoschus esculentus*)[36]种子的老化引发处理研究中得到验证。因此,种子体内一定含量的 GA 对老化具有明显的抑制作用,那么未来是否可以通过增施一定量的 GA 并配合其他农艺手段来有效延长稀有物种种子寿命,还有待后续深入的研究考证。以上研究可以看出,相关保护酶活性降低和内源激素失衡是种子发生老化和劣变的主要原因。另有报道显示在对种子做加速老化处理时,当达到一定的热处理温度和时间,耐老品种将会产生一定分子量的特异蛋白[37-38]。热稳定蛋白的含量与种子老化趋势呈负相关,并且此类蛋白可能作为一种应激老化胁迫蛋白与作物的耐老化性及种子活力的丧失有关。

通过对人工老化和自然老化种子的综合研究,众多关于种子的老化特性、活力检测条件、活力评价指标得以一一揭晓。以上研究进展也充分显示,衰老种子涉及到内源激素比例失调、保护酶活性减弱、蛋白含量改变、质膜完整性受损等复杂多变的生理生化反应。那么,究竟是什么样的内在机理驱使和启动种子走向老化和死亡呢? 越来越多的国内外学者开始从细胞器分析,蛋白代谢,以及分子信号转导途径,核酸代谢等诸多角度,尝试解释种子老化机制。

2 种子衰老的生理生化解释

2.1 Amadori-Maillard 反应促进种子老化

具有生理活性的正常种子当被干燥到其含水量小于5%时,其细胞质将由粘液态转变为玻璃态[39-40]。种子老化涉及的生理生化反应受其内外水分的热力学状态(如水势,水活动性,焓差,以及熵)控制[13,41-42];并且低水分含量以及低温可以降低老化种子内部的酶活性,从而阻碍种子发生涉及酶促反应的生化劣变[12]。因此,干燥条件下的种子(玻璃态种子)所发生非酶促反应"阿尔多瑞-美拉德反应"(A-M, Amadori-Maillard reactions)产物将会使细胞清除活性氧的能力下降,膜脂的过氧化程度加强,并且 A-M 反应产物很可能通过对 DNA 双链结构的修饰,改变其生化功能,从而促进种子的衰老与死亡[43-44]。进一步的研究发现,A-M 反应涉及到由细胞内糖类减少而引起对蛋白质进行的非酶促反应攻击,以及复合物的分子重排;由此产生的褐色细胞毒素产物也会对细胞结构及其功能造成极大程度地损害[45-46]。作为最普遍的 A-M 产物—糖化蛋白、高级糖基化合物在各类种子老化或贮存过程中会随着老化程度的增强而不断增加[41,45-48]。因此,当对供试种子进行脱水处理(含水量小于5%)后,老化组织中大量减少的游离糖类启动了 A-M 反应,同时由此产生的细胞毒素产物更进一步加速了种子老化进程。例如:从对自然老化并且干燥的豌豆(*Pisum sativum*),黄瓜(*Cucumis sativus*),以及荞麦(*Fagopyrum esculentum*)种子的研究中发现,风干种子内部碳水化合物的水解程度会随着其老化程度的加强而加强,风干的老化种子内部的结合水参与了糖类水解反应,并且 A-M 反应产物在老化种子重新吸胀时关闭了水通道和降低了细胞膜的透水性[49]。另外,随着老化时间的延长,老化程度的加深,娑罗双树(*Shorea robusta*)种子不同部位(胚轴以及子叶)的 A-M 产物—酮醛类,过氧化氢等均呈逐渐增多的趋势[41]。因此,当种子内部处于玻璃态(含水量小于5%)时,A-M 产物(MDA,以及寡糖等)通过破坏细胞内保护酶系统平衡、扰乱胞内结合水正常代谢途径、对核酸进行共价修饰等,从而加剧活性氧的累积,达到促进种子老化的目的[46]。然而关于动态监控 A-M 产物在老化种子不同组织部位的分布、轨迹、以及定量分析,目前鲜有报道。

在自然环境下,种子的含水量会随着周围环境变化而波动[50],鉴于水分含量的不同以及不同的分子活动性,干燥和水合种子在衰老过程中总是走不同路线[51,13]。Kranner 等[52]也认为在水合种子中,虽然不能排除 A-M 反应导致的细胞死亡,但是水合种子的老化的确更可能与可控的、活跃的生化活动即酶促反应有关。由此可知,在一定程度的干燥条件下,作为非酶促反应之一的 Amadori-Maillard 反应加速了种子的老化进程。

2.2 膜脂过氧化作用与种子老化

活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)通过对质膜诱发过氧化作用而被认为是降低膜完整性的首要因子[53-57]。氧原子携带两个多余的电子将会间接产生超氧阴离子,过氧化氢以及羟自由基,即使种子内少量的水分都会使得这些 ROS 扩散至其他细胞器、质膜等部位并与之发生氧化还原反应,从而破坏细胞内环境的电化学势稳态[58]。首先,羟自由基可以启动有机分子一系列的过氧化反应,其中对质膜中的不饱和脂肪酸的强氧化作用最为明显,并且加速破坏脱氧核糖、嘌呤以及嘧啶的生化结构[24]。Ouzouline[59]小组通过比较两种软粒小麦(*Triticum aestivun*)在老化处理前后质膜组分的变化发现,老化处理的小麦种子质膜磷脂酰胆碱成分(不饱和脂肪酸,油酸,亚油酸组分)显著减少,认为老化处理加速了 ROS 对质膜的过氧化作用,由此加大了膜透性;类似的结果在绿番茄(*Physalis philadelphica*)[60],甜辣椒(*Capsicum annuum*)[24],苦楝树[61],豌豆(*Pisum sativum*)、山藜豆(*Lathyrus pratensis*)、金雀儿(*Cytisus scoparius*)[62]种子的老化研究中均有报道。这些研究表明老化种子的发芽率大幅降低与其膜脂过氧化程度显著相关。第二,近年来越来越多的学者开始探究老化种子不同部位包括胚,胚乳,子叶等的 ROS 分布轨迹,试图更加密切地探究其对质膜的氧化作用机理。如:不同贮存年限的欧洲山毛榉(*Fagus sylvatica*)老化种子在荧光下被监测到其胚轴内活性氧含量远大于子叶中的含量[58];而在老化萝卜种子(*Rapanus sativus*)也被发现种皮内含有比胚轴内高 16 倍的 ROS 水平[63]。这说明 ROS 在根部顶端分生组织大量积累,致使胚轴无法伸出,而抑制了胚细胞分裂。第三,从酶学以及基因组学

角度来看,涉及种子老化的膜脂劣变的主要原因是磷脂酶活化以及实现相关基因的表达造成的[64]。具体表现为:老化能够促进磷脂酶(PLD)的活化因而大量降解膜脂的主要成分—磷酸酰胆碱(PC)和磷酸酰乙醇胺(PE);同时老化处理能够显著诱导涉及脂肪酸降解的脂氧合酶基因(OsLOX2)的转录[64]。Lee[65]等也认为抑制 PLD 的活性,将有利于大豆种子的贮存。由此说明,ROS 的累积以及自由移动,保护酶活性减弱,是导致种子细胞质膜完整性降低的重要因素之一,同时不可忽略的是,当外部的水热条件满足时,引发质膜完整性降低的因素还可能是磷脂酶以及脂氧合酶的活化而引起的酶促反应所造成。老化种子的发芽率大幅降低与其膜脂过氧化程度呈显著正相关。

2.3　ROS 对种子生死的双重作用

目前,越来越多的研究已充分表明 ROS 在种子衰老过程却扮演双重作用,而作用的正负性往往取决于种子含水量[66-71]。在干燥种子中,ROS 更倾向分布于靠近其产生部位,相反,在有自由水的水合种子中,ROS(H_2O_2)更易扩散至距其产生部位较远的靶位点;一般认为,产生于干燥种子的 ROS 更可能在当此种子在吸胀的时候,作为一种胞内的信使起到正向地调控种子萌发作用[66]。最新研究报道,在长期贮存过程中,尤其在高温高湿环境下,种子的发芽能力以及活力的丧失与 H_2O_2和超氧阴离子的积累具有密切联系;而缺水的干燥种子因其内部分子流动性受到玻璃体结构的限制致使其生化代谢停止[67]。因此种子细胞粘液态对 ROS 的双重角色的发挥具有重要意义[68-69],并且在细胞粘液态下 ROS 作用正负性还可能涉及深层次的胞内外信号转导调控。例如,施加 0.05%的 H_2O_2水溶液(加 $CaSO_4$),能够显著提高老化玉米(*Zea mays*)种子的发芽率、胚和胚乳的氧气消耗率,以及乙醇脱氢酶(ADHase)的活性,这表明适量的 H_2O_2促进老化种子的生物代谢[70]。从以上研究可以看出,水分是促成 ROS 移动并发挥强氧化作用的首要因素之一[71]。一方面,当种子储藏于高温高湿的热带环境下,其老化劣变的进程会显著加速。另一方面,适量的 ROS 则可作为种子萌发的信号转导因子。但是,关于 ROS 影响种子萌发或者劣变的临界阈值以及作用的动态机理研究,鲜见报道。有待于多层次的系统化探讨。

2.4　蛋白羰基化作用与种子老化

蛋白质羰基化是蛋白质的非酶促的不可逆羰基修饰[49,67,72]。有学者认为 ROS 是通过改变质膜上转运蛋白而非磷脂双分子层的结构和功能从而致使生物膜透性增大,膜完整性降低[24]。更深层次的研究则表明金属羰基物是 ROS 攻击赖氨酸(Lys),精氨酸(Arg),脯氨酸(Pro)以及蛋白质侧链上的氨基和亚氨基而直接产生的[73-74]。研究显示老化拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种子活力的缺失或者下降是由干燥种子内蛋白质的改变和低活力的种子在萌发时无法表现正常的蛋白质组特性而引起的[75];另外,在玉米种子老化处理研究中发现,伴随着葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性的降低,丙酮以及 ATP 的减少,干燥玉米胚芽中有 16 种蛋白质被上调[76]。这表明,可控的种子劣变处理强烈增加了蛋白质的羰基化反应,这很可能会导致种子蛋白的功能特性的缺失或者促进酶对水解反应的敏感性;同时老化影响了细胞信号的转导以及基因的转录,因此干扰了正常的糖酵解,三羧酸循环,以及呼吸电子传递链和氧化磷酸化等生化过程。进一步研究显示,随着贮存年限的增长,自然老化的欧洲山毛榉(*Fagus sylvatica*)种子内羰基蛋白含量[脱水蛋白、USP(Anti-Universal Stress Protein)、TCP-1(T-complex protein 1)、RAD23-3、以及 14-3-3 蛋白]逐渐增多,这样的趋势在后续吸胀处理过程中一直都没有改变[67];而人工老化的小麦种子在处理前后也表现出升高的可溶性糖含量和降低的可溶性蛋白含量,以及一定量的脯氨酸积累[77-79]。因此,不论是自然还是人工老化种子,老化过程均涉及到了蛋白结构的修饰以及改变、蛋白合成能力受阻,相关保护酶活性降低,以及水孔通道功能失调等特点,而伴随蛋白羰基化过程的深入,其反应产物则又进一步加剧老化、加速种子内部生理生化劣变,最终导致细胞死亡。

然而,在对印度芥菜种子(*Brassica juncea*)[80]以及秋葵[81]人工老化处理过程中,并未检测到蛋白条带的变化,研究者认为由老化引起的种子活力降低并不是蛋白结构的改变引起,而是自由基所导致的膜脂过氧化反应造成的[80-81]。尽管不同物种种子衰老的生理特性(见 1.1,1.2)具有一致性,但究竟是蛋白羰基化还是膜脂过氧化作用而导致的种子老化以及活力丧失呢? 从目前的研究进展看,并非单一因素造成种子劣变的发

生,首先涉及到品种的遗传特异性(耐老特性,单双子叶等),其次关乎其内外环境的水热条件(干燥、水合等),再次与种子本身所处的生理状态(老化阶段以及程度)都具有不同程度的相关性,而蛋白羰基化作用则是促进种子老化的最主要因素之一。

2.5 核酸裂解、线粒体机能改变与种子老化

早在 1976 年,有学者观察到在干燥失活的黑麦(*Secale cereale*)种胚中产生 18S 的 rRNA 逐步劣变,并且伴随着吸胀作用的发生其劣变状态也随之加深[82]。硬粒小麦[83]的老化种胚、胚乳,抗旱蓝藻(*Cyanobacteria*)[84]以及老化豌豆种子[52]中也分别被监测到逐步劣变的 rRNA、被 A-M 产物修饰的 DNA 和 DNA ladder。众所周知,DNA Ladder 已被看做 PCD 事件发生的标记物。当前,有学者尝试从有关老化涉及的细胞程序性(Programmed)以及非程序性(Non-Programmed)死亡两方面综合解释其原因[52]。在所有从分子水平上探究细胞程序性死亡(PCD)的报告中,普遍认为老化细胞信号转导刺激了线粒体功能的改变而致使内部生化代谢紊乱。具体表现为:伴随老化程度的加深,MAPK(mitogen-activated protein kinase, 丝裂原活化激酶)被激活并促进 Bax 以及 Bcl 类似基因启动,于此同时细胞色素 C 在 Ca^{2+}的作用下,将经由线粒体被“调遣”至细胞质寻找并激活 metacaspase,由此导致了核心蛋白,核酸,以及细胞骨架发生系统性的降解和退化(图 1)[52]。更加完善的发现则表明,老化不但涉及经由基因表达调控而引起的 PCD 反应而且还与 Non-PCD 关系密切。原因是在涉及 PCD 复杂反应的流程中,还存在着“nano-switches”的化学反应,作为 PCD 的支路而驱使缓慢的非程序性(Non-programmed)生化事件的发生[52]。不论是脂质过氧化作用,蛋白羰基化作用,还是核酸随机发生的点突变以及共价修饰(A-M 反应产物修饰),其产物都将成为促进种子老化的诱导因子(第二诱毒素信号分子)(图 1)。每一种引发老化的因素既是起因(Cause)加速劣变的进程,也同时可以作为老化的结果(Effector)[52]。

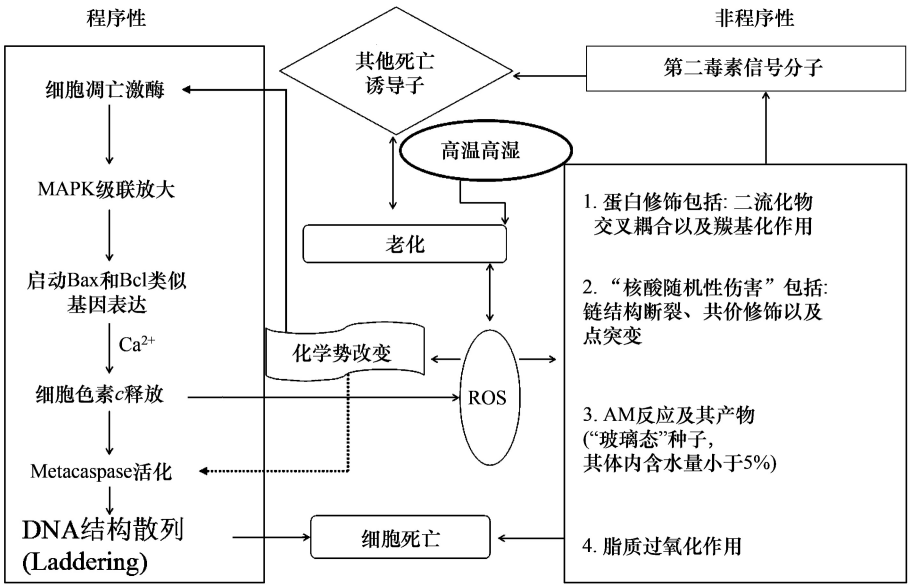


图 1 种子老化过程中细胞死亡机理流程简图(参考 Kranner I(2011)[52]改绘)

Fig.1 Simplified scheme of mechanisms that contribute to cell deaths during seed aging

Kranner[85]对豌豆种子的老化特性研究也表明,细胞氧化还原电位的改变与种子活力丧失有关,并且当老化涉及的核酸在内切酶作用下发生解体时,这一相关性更加明显;从转录水平分析来看,涉及质膜代谢、氧胁迫、以及蛋白泛素化基因的改变均发生在种子老化的初期;而老化种子的种胚以及胚乳内的核酸降解程度也不同[83],这说明种子老化具有时空异质性。另外,老化燕麦(*Avena sativa*)[86]、大豆[87]种子表现出例如:线粒体肿胀和双层膜损伤以及呼吸功能下降、标记酶(SOD,APX,GR,等)活性降低、ASC-GSH(抗坏血酸-谷胱甘肽)循环活性减慢等典型的线粒体功能衰竭特征。综上所述,种子老化涉及到了调控 PCD 的基因的表达、线

粒体机能改变、氧胁迫、以及蛋白质的泛素化作用,同时一系列复杂的的非程序性事件也伴随种子的劣变而发生,形成了具有“起因-结果”的闭合、交叉式的链式关系。

此外,从转基因角度考察种子衰老问题,一方面可以透视种子老化深层机理,同时也在一定程度上能够实现延长种子寿命的可能。例如:通过在烟草质粒内实现同时超量表达铜锌超氧化物歧化酶(CuZnSOD)和抗坏血酸过氧化氢酶(APX),结果表明转基因烟草不但可以对任意严苛的非生物胁迫表现出强的抵抗性,而且相对于老化的对照组来说,具有更高的保护酶活性和更低的离子渗透率[88]。最新研究还发现,经分离得到的表型为长寿的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)显性突变体,具有超量表达的 RSL1(Ring finger of Seed Longevity1)基因,而研究证实此基因负责编码具锌指纹的环状泛素连接酶,进一步研究发现,RSL1 加速了赤霉素的分泌而实现种子寿命的延长,因此研究者推测 RSL1 是作为种子在面临衰老时是否存活的限制性因素[66]。

3　结论与展望

综合来看,可靠的外界贮存条件(低温,低含水量),以及其内部充足而健全的保护酶系统、平衡稳定的内源激素系统,是种子最大程度地避免老化,达到持续保有活力以及发芽能力的必备因素,这对稀有以及濒危植物物种种质资源延续以及创新具有重要价值。

1. 目前对 ROS 加速种子老化、劣变的研究为数众多,但是研究较为表象、单一或者片面。只专注于 ROS 在种子老化期间单方面的负向作用,而忽略其在种子萌发时所具有特定正向的信号转导调控机能;另外,ROS 的综合作用与种子含水量息息相关,但是目前大多数此类研究往往顾此失彼。因此,探究老化机理之前,对种子本身含水量的把握将成为研究突破口;尤其是在探究玻璃态种子(含水量<5%)在其重新吸胀萌发时,对 ROS 进行实时连续的定性定量监控,将会更加彻底地揭示种子老化机理。另一方面,种子内线粒体是 ROS 积累的主要细胞器,考察线粒体在老化前后的生理生化特性以及机能改变,可以成为研究涉及衰老的细胞程序性死亡的靶点。

2. 从目前分子以及转录水平考察和调节相关促进老化的生物酶,如脂氧合酶以及磷脂酶的代谢和表达,跟踪其作用位点以及信号转导途径等的研究,虽然能够较为深入了解老化的酶促反应途径,但是,其局限性在于在考虑细胞膜完整性降低的同时,并未兼顾膜蛋白生理机能的改变;而对于种子不同部位(胚乳、子叶等)、不同时期老化的综合比较研究也涉及甚少。因此,精细考察并比较种子老化过程中所涉及的不同部位、老化涉及的不同时期(老化初期,中期,后期)生理生化变化,包括其在吸胀过程中(胚轴,子叶,以及胚乳内)动态的物质以及能量变化、氧化还原电位变化、蛋白表达情况、以及核酸代谢情况,有利于探讨种子不同部位的老化情况以及判断老化的独立性或者相依性的机理。

3.单独涉及种子老化的 PCD 以及 Non-PCD 的理化反应、生化事件的研究报道较为广泛;而对这两者之间的过渡性、连接性的生化反应,包括其反应特点、作用机理等的探究却鲜有报道。老化不但涉及经由基因表达调控而引起的 PCD 反应;同时每一种引起老化的因素(AM 反应,蛋白羰基化作用,膜脂过氧化作用)均可作为种子 Non-PCD 的可能结果,这就形成了具有“起因-结果”的闭合、交叉式的链式关系。因此考察 PCD 与 Non-PCD 之间的过渡生化反应机理有助于全面破解种子老化之谜。此外,目前对种子老化的研究多集中于传统的生理生化过程和内外影响因子的相对独立变化研究。缺乏系统综合的多层面系统性的动态研究。随着探讨生命衰老机理的生物技术日新月异,通过蛋白组学、酶学、基因工程技术和转录组测序等新技术的应用,必将对种子老化机理机制的揭示有突破性进展。

参考文献(References):

[1] Álvarez-Espino R, Godínez-Álvarez H, De la Torre-Almaráz R. Seed banking in the columnar cactus stenocereus stellatus: distribution, density and longevity of seeds. Seed Science Research, 2014, 24(4): 315-320.

[2] Helsen K, Hermy M, Honnay O. Changes in the species and functional trait composition of the seed bank during semi-natural grassland assembly: seed bank disassembly or ecological palimpsest? Journal of Vegetation Science, 2015, 26(1): 58-67.

[3] Ramlall C, Varghese B, Ramdhani S, Pammenter N W, Bhatt A, Berjak P, Sershen. Effects of simulated acid rain on germination, seedling growth and oxidative metabolism of recalcitrant-seeded *Trichilia dregeana* grown in its natural seed bank. Physiologia Plantarum, 2015, 153(1): 149-160.
[4] 李秀璋, 方爱国, 李春杰, 南志标. 禾草内生真菌对其它微生物的影响研究进展. 生态学报, 2015, 35(6): 1660-1671.
[5] 戴尔阜, 黄宇, 赵东升. 草地土壤固碳潜力研究进展. 生态学报, 2015, 35(12), http://www.cnki.net/kcms/detail/10.5846/stxb201310212541.html.
[6] 宋敏, 刘银占, 井水水. 土壤线虫对气候变化响应的研究进展. 生态学报, 2015, 35(20), http://dx.doi.org/10.5846/stxb201404220796.
[7] 徐耀粘, 江明喜. 森林碳库特征及驱动因子分析研究进展. 生态学报, 2015, 35(3): 926-933.
[8] 彭羽, 卿凤婷, 米凯, 薛达元. 生物多样性不同层次尺度效应及其耦合关系研究进展. 生态学报, 2015, 35(2): 577-583.
[9] 马晓哲, 王铮. 土地利用变化对区域碳源汇影响研究进展. 生态学报, 2015, 35(17), http://dx.doi.org/10.5846/stxb201312112932.
[10] 刘焱序, 彭建, 汪安, 谢盼, 韩忆楠. 生态系统健康研究新进展与趋向. 生态学报, 2015, 35(18), http://www.cnki.net/kcms/detail/10.5846/stxb201401060032.html.
[11] Murthy U M N, Kumar P P, Sun W Q. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(384): 1057-1067.
[12] Priestley D A. Seed Aging. Ithaca: Cornell University Press, 1986: 39-75.
[13] Walters C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. Seed Science Research, 1998, 8(2): 223-244.
[14] McDonald M B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. Seed Science and Technology, 1999, 27(1): 177-237.
[15] 闫慧芳, 夏方山, 毛培胜. 种子老化及活力修复研究进展. 中国农学通报, 2014, 30(3): 20-26.
[16] Miquel J, Economos A C, Fleming Jr J E, Johnson Jr. Mitochondrial role in cell aging. Experimental Gerontology, 1980, 15(6): 579-591.
[17] Chen G, Wang Q Z, Liu Y, Li Y B, Cui J, Liu Y Y, Liu H T, Zhang Y W. Modelling analysis for enhancing seed vigour of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) using an ultrasonic technique. Biomass and Bioenergy, 2012, 47: 426-435.
[18] Wang Q Z, Chen G, Yersaiyiti H, Liu Y, Cui J, Wu C H, Zhang Y W, He X Q. Modeling analysis on germination and seedling growth using ultrasound seed pretreatment in switchgrass. PLoS One, 2012, 7(10): e47204.
[19] 陈志德, 王州飞, 刘永惠, 王军, 张祖明, 沈一. 花生种子人工老化对萌发期种子活力的影响. 江苏农业学报, 2011, 27(6): 1422-1413.
[20] Demirkaya M. Relationships between antioxidant enzymes and physiological variations occur during ageing of pepper seeds. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 2013, 54(2): 97-102.
[21] 王小丽, 李鸿雁, 李志勇, 师文贵. 人工老化对蔊菜豆种子活力与生理特性的影响. 安徽农业学报, 2010, 38(1): 515-517, 535.
[22] 吴聚兰, 周小梅, 范玲娟, 李君剑, 张鑫鑫, 张海生. 人工老化对大豆种子活力和生理生化特性的影响. 中国油料作物学报, 2011, 33(6): 582-587.
[23] 刘明久, 王铁固, 陈士林, 王春虎, 赵新亮. 玉米种子人工老化过程中生理特性与种子活力的变化. 核农学报, 2008, 22(4): 510-513.
[24] Kaewnaree P, Vichitphan S, Klanrit P, Siri B, Vichitphan K. Effect of accelerated aging process on seed quality and biochemical changes in sweet pepper (*Capsicum annuum* Linn.) seeds. Biotechnology, 2011, 10(2): 175-182.
[25] 梅鸿献, 刘艳阳, 武轲, 杜振伟, 郑永战. 芝麻种子老化处理生理特性变化及种子活力适宜检测方法研究. 华北农学报, 2013, 28(5): 169-174.
[26] 吴浩, 周青平, 颜红波, 梁国玲, 刘文辉, 魏小星, 刘勇. 垂穗披碱草种子老化过程中生理生化特性的研究. 青海大学学报: 自然科学版, 2014, 32(3): 6-10.
[27] 李淑梅, 王付娟, 董丽平, 孙君艳, 仝胜利. 黑麦草老化处理后种子活力和生理生化特性的变化. 黑龙江农业科学, 2015, (1): 133-135.
[28] Lazar S L, Mira S, Pamfil D, Martínez-Laborde J B. Germination and electrical conductivity tests on artificially aged seed lots of 2 wall-rocket species. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 2014, 38: 857-864.
[29] 廖乐, 齐军仓, 吕小兰, 华淼源, 刘馨月, 王丹丹, 余泽新. 人工老化对大麦种子活力的影响. 种子, 2014, 33(8): 71-74.
[30] de Tunes L M, Tavares L C, Rufino C D, Barros A C S A, Muniz M F B, Duarte V B. Accelerated aging of broccoli seeds(*Brassica oleracea* L. Italica Plenk). Bioscience Journal, 2012, 28(2): 173-179.
[31] de Tunes L M, Pedroso D C, Gadotti G I, Muniz M F B, Barros A C S A, Villela F A. Accelerated aging to assess parsley seed vigor. Horticultura Brasileira, 2013, 31(3): 457-460.
[32] Groot S P C, Surki A A, de Vos R C H, Kodde J. Seed storage at elevated partial pressure of oxygen, a fast method for analysing seed ageing under dry conditions. Annals of Botany, 2012, 110(6): 1149-1159.
[33] 蔡春菊, 范少辉, 刘凤, 曹帮华. 毛竹种子人工老化过程中生理生化变化. 林业科学, 2013, 49(8): 29-34.
[34] Tammela P, Salo-Väänänen P, Laakso I, Hopia A, Vuorela H, Nygren M, Tocopherols, tocotrienols and fatty acids as indicators of natural ageing in *Pinus sylvestris* seeds. Scandinavian Journal of Forest Research, 2005, 20(5): 378-384.
[35] Tabatabaei S A. The Effect of priming on germination and enzyme activity of sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds after accelerated aging. Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 2013, 9(4): 132-138.
[36] Raj D, Dahiya O S, Arya R K, Kumar Yadav A, Kumar K. Improvement in germination characteristics in artificially aged seeds of okra (*Abelmoschus esculentus*) by osmoconditioning. Indian Journal of Agricultural Sciences, 2013, 83(7): 699-702.

[37] 王凤敏, 粟建光, 龚友才, 戴志刚, 陈基权, 郑海燕, 李燕. 不同红麻种子耐老化性差异及热稳定蛋白的研究. 植物遗传资源学报, 2010, 11(1): 5-9.
[38] 范国强, 傅家瑞. 花生种子老化与蛋白质变化关系的研究. 种子, 1996, (2): 6-8.
[39] Sun W Q, Leopold A C. Glassy state and seed storage stability: a viability equation analysis. Annual Botany, 1994, 74(6): 601-604.
[40] Williams R J, Leopold A C. Glassy state in corn embryos. Plant Physiology, 1989, 89: 977-981.
[41] Parkhey S, Naithani S C, Keshavkant S. Protein metabolism during natural ageing in desiccating recalcitrant seeds of *Shorea robusta*. Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 36(7): 1649-1659.
[42] Krishnan P, Shantha, Nagarajan, Moharir A V. Biophysical characterization of seed water status and its relationship with seed viability. Proceedings of the Indian National Academy Part B Biological Sciences, 2006, 71(3/4): 163-179.
[43] 贾立国, 樊明寿. 种子理化反应与种子衰老关系的研究进展. 中国农学通报, 2006, 22(4): 260-263.
[44] Murthy U M N, Sun W Q. Protein modification by Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. Journal of Experimental Botany, 2000, 51(348): 1221-1228.
[45] Wettlaufer S H, Leopold A C. Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. Plant Physiology, 1991, 97(1): 165-169.
[46] Murthy U M N, Liang Y, Kumar P P, Sun W Q. Non-enzymatic protein modification by the Maillard reaction reduces the activities of scavenging enzymes in *Vigna radiata*. Physiology Plantarum, 2002, 115(2): 213-220.
[47] Strelec I, Ugarčić-HardiŽ, Hlevnjak M. Accumulation of Amadori and Maillard products in wheat seeds aged under different storage conditions. Croatica Chemica Acta, 2008, 81(1): 131-137.
[48] Kibinza S, Vinel D, Côme D, Bailly C, Corbineau F. Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. Physiologia Plantarum, 2006, 128(3): 496-506.
[49] Veselovsky V A, Veselova T V. Lipid peroxidation, carbohydrate hydrolysis, and Amadori-Maillard reaction at early stages of dry seed aging. Russian Journal of Plant Physiology, 2012, 59(6): 811-817.
[50] Mickelson J A, Grey W E. Effect of soil water content on wild oat (*Avena fatua*) seed mortality and seedling emergence. Weed Science, 2006, 54(2): 255-262.
[51] Buitink J, Leprince O. Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. Cryobiology, 2004, 48(3): 215-228.
[52] Kranner I, Chen H Y, Pritchard H W, Pearce S R, Birtić S. Inter-nucleosomal DNA fragmentation and loss of RNA integrity during seed ageing. Plant Growth Regulation, 2011, 63(1): 63-72.
[53] Hendry G A F, Finch-Savage W E, Thorpe P C, Atherton N M, Buckland S M, Nilsson K A, Seel W E. Free radical prosesses and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. New Phytologist, 1992, 122(2): 273-279.
[54] Pukacka S, Ratajczak E. Antioxidative response of ascorbate-glutathione pathway enzymes and metabolites to desiccation of recalcitrant *Acer saccharinum* seeds. Journal of Plant Physiology, 2006, 163(12): 1259-1266.
[55] Berjak P, Pammenter N W. From *Avicennia* to *Zizana*: seed recalcitrance in perspective. Annual Botany, 2008, 101(2): 213-228.
[56] Roach T, Beckett R P, Minibayeva F V, Colville L, Whitaker C, Chen H, Bailly C, Kranner I. Extracellular superoxide production, viability and redox poise in response to desiccation in recalcitrant *Castanea sativa* seeds. Plant Cell Environment, 2010, 33(1): 59-75.
[57] Parkhey S, Naithani S C, Keshavkant S. ROS production and lipid catabolism in desiccating *Shorea robusta* seeds during aging. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 57: 261-267.
[58] Ratajczak E, Malecka A, T Bagniewska-Zadworna A, Kalemba E M. 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.
[59] Ouzouline M, Tahani N, Demandre C, El Amrani A, Benhassaine-Kesri G, Caid H S. Effects of accelerated aging upon the lipid composition of seeds from two soft wheat varieties from Morocco. Grasas y Aceites, 2009, 60(4): 367-374.
[60] Pichardo-González J M, Ayala-Garay Ó J, González-Hernández V A, Flores-Ortiz C M. Fatty acids and physiological quality of tomatillo (*Physalis philadelphica* Lam.) seed during natural ageing. Chilean Journal of Agricultural Research, 2014, 74(4): 391-396.
[61] Kumar D, Mishra D K. Variability in permeability and integrity of cell membrane and depletion of food reserves in neem (*Azadirachta indica*) seeds from trees of different age classes. Journal of Forestry Research, 2014, 25(1): 147-153.
[62] Colville L, Bradley E L, Lloyd A S, Pritchard H W, Castle L, Kranner I. Volatile fingerprints of seeds of four species indicate the involvement of alcoholic fermentation, lipid peroxidation, and Maillard reactions in seed deterioration during ageing and desiccation stress. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(18): 6519-6530.
[63] Bellani L M, Salvini L, Dell'Aquila A, Scialabba A. Reactive oxygen species release, vitamin E, fatty acid and phytosterol contents of artificially aged radish (*Raphanus sativus* L.) seeds during germination. Acta Physiologiae Plantarum, 2012, 34(5): 1789-1799.
[64] Wang F W, Wang R, Jing W, Zhang W H. Quantitative dissection of lipid degradation in rice seeds during accelerated aging. Plant Growth Regulation, 2012, 66(1): 49-58.
[65] Lee J, Welti R, Roth M, Schapaugh W T, Li J R, Trick H N. Enhanced seed viability and lipid compositional changes during natural ageing by suppressing phospholipase Dα in soybean seed. Plant Biotechnology Journal, 2012, 10(2): 164-173.
[66] Bueso E, Ibañez C, Sayas E, Muñoz-Bertomeu J, Gonzalez-Guzmún M, Rodriguez P, Serrano R. A forward genetic approach in *Arabidopsis thaliana* identifies a Ring-type ubiquitin ligase as a novel determinant of seed longevity. Plant Science, 2014, 215-216: 110-116.

[67] Kalemba E M, Pukacka S. Carbonylated proteins accumulated as vitality decreases during long-term storage of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. Trees, 2014, 28(2): 503-515.

[68] Mira S, Estrelles E, González-Benito M E, Corbineau F. Biochemical changes induced in seeds of *Brassicaceae* wild species during ageing. Acta Physiologiae Plantarum, 2011, 33(5): 1803-1809.

[69] El-Maarouf-Bouteau H, Mazuy C, Corbineau F, Bailly C. DNA alteration and programmed cell death during ageing of sunflower seed. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(14): 5003-5011.

[70] Liu G D, Porterfield D M, Li Y C, Klassen W. Increased oxygen bioavailability improved vigor and germination of aged vegetable seeds. HortScience, 2012, 47(12): 1714-1721.

[71] Bailly C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Science Research, 2004, 14(2): 93-107.

[72] Keshavkant S, Padhan J, Parkhey S, Naithani S C. Physiological and antioxidant responses of germinating *Cicer arietinum* seeds to salt stress. Russian Journal of Plant Physiology, 2012, 59(2): 206-211.

[73] Job C, Rajjou L, Lovigny Y, Belghazi M, Job D. Patterns of protein oxidation in Arabidopsis seeds and during germination. Plant Physiology, 2005, 138(2): 790-802.

[74] Kumar G N M, Knowles N R. Age of potato seed-tubers influences protein synthesis during sprouting. Physiologia Plantarum, 1993, 89(2): 262-270.

[75] Rajjou L, Loviqny Y, Groot S P C, Belghazi M, Job C, Job D. Proteome-wide characterization of seed aging in Arabidopsis: a comparison between artificial and natural aging protocols. Plant Physiology, 2008, 148(1): 620-641.

[76] Xin X, Lin X H, Zhou Y C, Chen X L, Liu X, Lu X X. Proteome analysis of maize seeds: the effect of artificial ageing. Physiologia Plantarum, 2011, 143(2): 126-138.

[77] Caid H S, Ecchemmakh T, Elamrani A, Khalid A, Boukroute A, Mihamou A, Demandre C. Alterations occurring during accelerated ageing of winter wheat. Cahiers Agriculture, 2008, 17(1): 39-44.

[78] Moncaleano-Escandon J, Silva B C F, Silva S R S, Granja J A A, Alves M C J L, Pompelli M F. Germination responses of *Jatropha curcas* L. seeds to storage and aging. Industrial Crops and Products, 2013, 44: 684-690.

[79] 张自阳, 姜小苓, 王娟娟, 陈培, 候轩轩, 茹振钢, 刘明久. 人工老化处理对小麦种子活力和醇溶蛋白、麦谷蛋白组成的影响. 河南农业科学, 2014, 43(2): 24-27.

[80] Goel A, Prasad G B K S. Effect of accelerated ageing on the total seed soluble proteins profile in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) seeds. Annals of Biology, 2014, 30(3): 445-447.

[81] Raj D, Dahiya O S, Yadav A K, Arya R K, Kumar K. Effect of natural ageing on biochemical changes in relation to seed viability in okra (*Abelmoschus esculentus*). Indian Journal of Agricultural Sciences, 2014, 84(2): 280-286.

[82] Dell'Aquila, Zocchi G, Lanzani G A, De Leo P. Different forms of EF1 and viability in wheat embryos. Phytochemistry, 1976, 15(11): 1607-1610.

[83] Spanò C, Buselli R, Castiglione RM, Bottega S, Grilli I. RNases and nucleases in embryos and endosperms from naturally aged wheat seeds stored in different conditions. Journal of Plant Physiology, 2007, 164(4): 487-495.

[84] Shirkey B, McMaster N J, Smith S C, Wright D J, Rodriguez H, Jaruga P, Birincioglu M, Helm R F, Potts M. Genomic DNA of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) becomes covalently modified during long-term (decades) desiccation but is protected from oxidative damage and degradation. Nucleic Acids Research, 2003, 31(12): 2995-3005.

[85] Kranner I. Mechanisms of seed ageing. South African Journal of Botany, 2013, 86(3): 140-140.

[86] Kong Q, Mao P S, Yu X D, Xia F S. Physiological changes in oat seeds aged at different moisture contents. Seed Science and Technology, 2014, 42(2): 190-201.

[87] Xin X, Tian Q, Yin G K, Chen X L, Zhang J M, Ng S, Lu X X. Reduced mitochondrial and ascorbate-glutathione activity after artificial ageing in soybean seed. Journal of Plant Physiology, 2014, 171(2): 140-147.

[88] Lee Y P, Baek K -H, Lee H -S, Kwak S -S, Bang J -W, Kwon S -Y. 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.