

种子活力或抗老化能力的分子机制研究进展

姜孝成*, 周诗琪

(湖南师范大学 生命科学学院 作物不育资源创新与利用湖南省重点实验室, 中国湖南 长沙 410081)

摘要: 种子代表高等植物生活史中的一个重要时期,也是种质多样性资源保存的重要载体。种子在贮藏过程中的老化是不可避免的,了解种子活力或抗老化能力的分子机制对于农业生产具有重要意义。本文对数量性状位点分子标记技术、全基因组关联分析、组学技术和基因工程等种子活力或抗老化能力的分子机制方面的研究进展进行了综述,以期通过分子设计育种技术改良种子的活力或抗老化能力提供理论指导。

关键词: 种子老化;数量性状位点(QTL);全基因组;组学;基因工程

中图分类号: Q945; Q756

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2021)05-0406-11

Research Progress on Molecular Mechanisms of Seed Vigor or Anti-aging Ability

JIANG Xiao-cheng*, ZHOU Shi-qi

(Hunan Province Key Laboratory of Crop Sterile Germplasm Resource Innovation and Application, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: Seeds represent an important period in the life history of higher plants and are also an important carrier for the preservation of plant germplasm diversity. Aging is inevitable during the storage process of seeds. Understanding the molecular mechanisms of seed vigor or anti-aging ability is of great significance in agricultural production. This article summarized the research progress of molecular mechanisms related to seed vigor or anti-aging ability from the aspects of molecular marker technology on quantitative trait loci (QTL), genome-wide association analysis, omics technology and genetic engineering. It may provide theoretical guidance for improving the vigor or anti-aging ability of seeds through molecular design breeding.

Key words: seed aging; quantitative trait loci (QTL); genome; omics; genetic engineering

(*Life Science Research*, 2021, 25(5): 406-416)

种质资源(germplasm resources)是生物遗传信息的载体,是现代种业的核心竞争力和农业科技原始创新的物质基础,是保障国家粮食、生态及能源安全的重要战略性资源^[1]。为避免种质资源的丢失,有必要对其安全保存^[2]。种子是种质资源保存的重要载体,但生理成熟后的种子在贮藏过程中质量会不可逆转地逐渐下降,这种变化称为老化或劣变(aging or deterioration)。种子因老化而面对外界胁迫挑战的脆弱性增加,种子活力降低^[3]。

种子老化程度因贮藏条件不当特别是高温高湿条件而不断加重^[4-5];在此期间,种子内部会发生一系列有害变化,例如种皮机械耐性下降^[6]、细胞膜损伤、蛋白质变性、DNA损伤和突变、核酸合成系统破坏等^[7-9],最终导致种子活力的丧失。如果种子在贮藏过程中老化或活力下降的问题得不到解决,就会造成种子萌发迟缓、生长势差、抗逆性弱、生物产量和经济产量降低,从而影响农业生产。近年来,随着分子生物学研究技术的发展,特别

收稿日期: 2021-08-12; 修回日期: 2021-09-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(32072125, 31671773); 湖南省生物发育工程及新产品研发协同创新中心项目(20134486)

作者简介: *通信作者: 姜孝成(1964—),男,湖南新化人,湖南师范大学教授,博士生导师,主要从事种子安全与分子生物学研究, E-mail: jxclc@hunnu.edu.cn。

是高通量测序技术和各种组学技术等的更新换代,在种子活力或抗老化能力方面的分子机制研究取得了显著进展,本文进行了相关综述,试图为进一步利用分子生物学技术手段提高农作物种子活力或抗老化能力,高效保存种质资源提供理论依据。

1 主要农作物种子活力或抗老化能力相关 QTLs 和候选基因鉴定

生物中大多数可见性状的遗传变异是受多基因控制的,这些性状被称为数量性状,控制数量性状的单个基因座(individual loci)即称为 QTL (quantitative trait loci)。种子活力即是由多基因控制的数量性状,适合 QTL 分析^[10-15]。QTL 分析首先根据某标记基因将待测群体划分为不同的基因型类别,然后使用相关统计分析来确定某个基因型的个体与其他基因型的个体在所测量的性状(表型)方面是否存在显著差异;如果表型显著不同,即被认为影响该性状的基因与标记基因连锁;然后对整个基因组中的其他标记基因重复该分析过程,以检测出尽可能多的与该性状连锁的标记基因。由于无法确定该性状是否是标记基因连锁的一个或多个基因相关,因此创造了数量性状基因座(QTL)一词来描述对数量性状有显著影响的染色体区域(通常通过与标记基因的连锁来定义)^[16]。确定一个 QTL 是否由一个或多个基因组成一直是数量遗传学中最困难的工作之一。近年来,水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)、玉米(*Zea mays*)、大豆(*Glycine max*)等主要农作物中与种子活力或抗老化相关的 QTLs 及候选基因鉴定备受关注。

1.1 水稻种子活力或抗老化能力相关 QTLs 和候选基因鉴定

杂交水稻自 1976 年开始商业化种植,目前已覆盖中国水稻总种植面积的 50% 以上。但杂交水稻种子由于贮藏耐性差或贮藏措施不当而导致种子质量下降,严重影响水稻生产的情况时有发生。因此,了解水稻种子活力或抗老化能力的分子机制,培育出种子贮藏耐性好的杂交水稻基因型至关重要^[17-18]。Li 等^[18]使用来自粳稻 CJ06 和籼稻 TN1 的杂交后代的 DH (double haploid) 株系群体,在 12 条染色体上检测到 19 个与种子活力相关的 QTLs,其中与萌发率相关的 QTL *qGP9* 定位在 9 号染色体(chromosome 9, Chr9)上。幼苗活力

是种子活力的表现之一,直接影响水稻的健壮成苗。Xie 等^[19]使用籼稻珍汕 97 和明恢 63 杂交的重组近交系(recombinant inbred lines, RILs)定位了 8 个与种子活力相关的 QTLs,其中, *qSV-1*、*qSV-5b*、*qSV-6a*、*qSV-6b* 和 *qSV-11* 影响幼苗建成, *qSV-5a*、*qSV-5c* 和 *qSV-8* 仅影响发芽;此外, *qSV-1*、*qSV-5b*、*qSV-6a*、*qSV-6b* 和 *qSV-8* 是低温特异性 QTLs。Abe 等^[20]利用来自粳稻 Kakehashi 和 Dungan Shali 杂交的 RILs,鉴定到 4 个与苗高相关的 QTLs,其中,控制苗高的 *qPHS3-2* 定位于 Chr3 长臂末端,并在该位点预测到一个与赤霉素(gibberellin, GA)生物合成相关的候选基因——*OsGA20ox1*。Jin 等^[21]以野生稻(*Oryza longistaminata*)与籼稻 9311 杂交后,再以 9311 作为轮回亲本得到的 BC₂F₂₀ 回交株系(backcross inbred lines, BILs)为材料,运用基因组重测序技术进行基因分型,检测到与种子活力相关的 36 个 QTLs;其中,老化过程中种子萌发能力相关的 *q9GR8.1* 与 *q9GP8.1* 拥有相同的定位,该位点包含 8 个候选基因(*MH08g0-020600*、*MH08g0020700*、*MH08g0020800*、*MH08g-0020900*、*MH08g0021000*、*MH08g0021100*、*MH08g0021200* 和 *MH08g0021-300*);老化处理种子萌发后的幼苗长度相关的 *q9SL1.1* 与 *q3SL1.1* 和 *q6SL1.1* 有相同定位,该位点鉴定到 15 个候选基因(*MH01g0725700*、*MH01g0725800*、*MH01g0725-900*、*MH01g0726000*、*MH01g0726100*、*MH01g072-6200*、*MH01g0726300*、*MH01g0726400*、*MH01g07-26500*、*MH01g0726600*、*MH01g0726700*、*MH01g0-726800*、*MH01g0726900*、*MH01g0727000* 和 *MH-01g0727100*)。Sasaki 等^[22]从来自 Milyang23/Akihikari 的 RILs,检测到了 4 个与种子寿命相关的 QTLs (*RC7*、*RC9-1*、*RC9-2* 和 *RC9-3*)。Jiang 等^[23]从来自 Milyang23/Tong88-7 和 Dasanbyeon/TR22-183 的两组 RILs,发现了 8 个与种子贮藏耐性相关的 QTLs (*qMT-SGC1.1*、*qMT-SGC5.1*、*qMT-SGC7.1*、*qMT-SGC7.2*、*qMT-SGC9.1*、*qDT-SGC2.1*、*qDT-SGC3.1* 和 *qDT-SGC9.1*)。Li 等^[24]利用 Koshihikari/Kasalath 的 BILs 种子,鉴定到位于 Chr2、Chr3、Chr4、Chr6、Chr9 和 Chr11 上与种子贮藏耐性相关的 6 个 QTLs (*qSS-2*、*qSS-3*、*qSS-4*、*qSS-6*、*qSS-9* 和 *qSS-11*)。Miura 等^[11]使用 Nip-ponbare/Kasalath 的 BILs,在 Chr2、Chr4 和 Chr9 上鉴定到 3 个与种子寿命相关的 QTLs (*qLG-2*、*qLG-4* 和 *qLG-9*)。Zeng 等^[25]利用来自籼粳杂交 ZYQ8/JX17

的 *DH* 株系, 检测到分别位于 Chr9、Chr11 和 Chr12 上的与种子贮藏耐性相关的 3 个 QTLs (*qLS-9*、*qLS-11* 和 *qLS-12*)。Xue 等^[26]使用来自籼粳杂交 IR24/Aso-minori 的 RILs, 获得了分别位于 Chr1、Chr3 和 Chr9 上与种子贮藏耐性相关的 3 个 QTLs (*qRGR-1*、*qRGR-3* 和 *qRGR-9*)。Lin 等^[27]使用以 N22 作为共同亲本的 Nanjing35 (ja-ponica)/N22//Nanjing35 的 BILs 和 USSR5 (japoni-ca)/N22 的 RILs, 在 Chr1、Chr2、Chr5、Chr6 和 Chr9 上鉴定到 7 个 QTLs, 包括两个群体种子所共有的 *qSSn-9*, 只存在于 BILs 的 *qSSnj-2-1*、*qSSn-2-2*、*qSSn-5*、*qSSn-6* 和只存在于 RILs 的 *qSSn-1*。Hang 等^[28]利用 Sasanishiki (粳稻)/Habataki (籼稻, 有强贮藏耐性)/Sasanishiki 的 BILs, 在 Chr1、Chr2、Chr3、Chr4、Chr5、Chr7、Chr11 和 Chr12 上鉴定到与种子贮藏耐性相关的 13 个 QTLs, 其中两个 QTLs (*qSSH-2-1* 和 *qSSH-2-2*) 与自然和人工老化均相关, 4 个 QTLs (*qSSH-4*、*qSSs-5-1*、*qSSs-5-2* 和 *qSSH-12*) 和 7 个 QTLs (*qSSH-1*、*qSSH-3-1*、*qSSH-3-2*、*qSSH-3-3*、*qSSH-7-1*、*qSSH-7-2* 和 *qSSH-11*) 分别与自然和人工老化相关。Yuan 等^[29]利用粳稻 Nipponbare 和籼稻 9311 的杂交后代的 BILs, 鉴定到位于 Chr1、Chr2、Chr3、Chr8、Chr9 和 Chr11 上与种子贮藏耐性相关的 7 个 QTLs (*qSS1*、*qSS2*、*qSS3.1*、*qSS3.2*、*qG6S8*、*qG6S9* 和 *qG6S11*), 其中 *qSS1* 被证实与种子贮藏耐性的改良有关, *qSS3.1* 为种子贮藏耐性和抗氧化胁迫能力所共有; 并从 *qSS3.1* 中筛选到 1 个编码脂肪酸羟化酶的候选基因 *OsFAH2*, 过表达 *OsFAH2* 能降低种子中脂质过氧化和提高种子贮藏耐性。

1.2 小麦、玉米和大豆等农作物种子活力或抗老化能力相关 QTLs 和候选基因鉴定

当前, 小麦、玉米和大豆等农作物中与种子活力或抗老化能力相关的 QTLs 也有报道。Shi 等^[30]利用小麦 Hanxuan 10 × Lumai 14 杂交后代的 *DH* 品系, 挖掘出与种子活力相关的 49 个 QTLs, 分别定位于 1B、2D、3A、3B、3D、4A、4D、5A、5B、5D、6D 和 7A 等 12 条染色体上, 并从 Chr5B 上分布的 13 个 QTLs (*QGEe5B*、*QGIe5B*、*QSLc5B*、*QSLd5B*、*QSLf5B*、*QRLd5B*、*QRLe5B*、*QRLf5B*、*QVId5B*、*QVle5B*、*QVIIf5B*、*QSVId5B* 和 *QSVIe5B*) 鉴定到 7 个候选基因 (*gRAESCS5B01G564900*、*gRAESCS5B01G564200*、*gRAESCS5B01G562600*、*graeCS5B02G562700*、*gRAESCS5B01G561300*、*gRAESCS5B01-*

G561400 和 *gRAESCS5B01G562100*), 这些基因主要参与调节老化种子萌发期间的碳水化合物和脂质代谢, 转录和细胞分裂等。Han 等^[31]基于两个玉米杂交组合 Yu82 × Shen137 和 Yu537A × Shen137, 通过单粒系选法获得两类 F_{10} RIL 群体, 鉴定到与种子活力相关的 65 个 QTLs, 其中 61 个 QTLs 被整合为 18 个 meta-QTLs (mQTLs) (用 BioMercator 2.1 对每条染色体上的 QTLs 进行整合分析, 当整合得到的某个 QTL 簇是两类 RIL 群体共有时称为 1 个 mQTL), 并从 13 个 mQTLs (mQTL1-1、mQTL1-2、mQTL3-1、mQTL3-2、mQTL3-3、mQTL3-4、mQTL4-2、mQTL4-3、mQTL5-2、mQTL6-1、mQTL6-2、mQTL7-1 和 mQTL7-2) 中鉴定到与玉米种子活力相关的 24 个候选基因 (226532762、224061823、242056533、195605946、162459222、327195227、302810918、*At1g45050*、224143836、162459414、*At5g19550*、*AT5G51440*、195658029、226508796、*At3g04120*、326509331、*AT1G57720*、*At5g67360*、45238345、*At1g70730*、*AT1G09640*、226247007、*AT1-G56340* 和 *AT3G21720*), 它们主要参与糖酵解途径和蛋白质代谢; 且推测 mQTL2、mQTL3-2、mQTL3-4 和 mQTL5-2 的染色体区域可能是与种子活力相关的热区 (hot spots)。Zhang 等^[32]以大豆品种 Zhengyanghuangdou × Meng 8206 (ZM6) 与 Linhefenqingdou × Meng 8206 (LM6) 杂交的两个 RILs 为材料, 共鉴定出 11 条染色体上与种子贮藏耐性相关的 34 个 QTLs, 其中 21 个 QTLs 分布在 4 条染色体 (Chr3、Chr5、Chr17 和 Chr18) 上 5 个 QTL 簇中, 位于 Chr17 和 Chr5 的两个簇上的 QTLs 的密度最高, 各有 7 个 QTLs (*qrGR-17-1*、*qrGR-17-2*、*qrFW-17-1*、*qrFW-17-2*、*qrGR-17-3*、*qrSL-17-1* 和 *qrFW-17-3*) 和 6 个 QTLs (*qGR-5-1*、*qGR-5-2*、*qFW-5-1*、*qGR-5-3*、*qFW-5-2* 和 *qrSL-5-1*), 分别被定义为 QTL hotspot A 和 QTL hotspot B。研究人员从这两个热点区域中已筛选到与种子发育、萌发和休眠, 种皮形成, 脂肪酸/脂质代谢过程和种子贮藏耐性等相关的 19 个候选基因 (*Glyma05g25030*、*Glyma05g25320*、*Glyma05g25460*、*Glyma05g25970*、*Glyma05g26150*、*Glyma05g26830*、*Glyma05g27190*、*Glyma05g27240*、*Glyma05g27250*、*Glyma05g28250*、*Glyma05g28950*、*Glyma05g29190*、*Glyma05g28030*、*Glyma05g28720*、*Glyma17g36080*、*Glyma17g36620*、*Glyma17g36730*、*Glyma17g37090* 和 *Glyma17g37110*), 但这些候选基因调控种子活

力或抗老化能力的分子作用机制及哪个或哪些是关键基因或主效基因、彼此间是否存在相互作用等尚未见报道。

2 GWAS 和多组学分析优化种子活力或抗老化能力相关 QTLs 和候选基因

2.1 GWAS 用于鉴定种子活力或抗老化能力相关 QTLs 和候选基因

全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)是以研究对象的基因组中大量单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)为分子遗传标记,通过将 SNPs 与某数量性状进行连锁作图,来获得该性状的 QTLs 的分析方法。与 QTL 连锁分析相比, GWAS 通常使用大量不相关的多样化种质为试验材料,以增加等位基因和单倍型的多样性,从而克服了 QTL 分析只能在特定 F₂ 代的杂交亲本之间或 RIL 群体内进行等位基因多样性分析,以及遗传图谱分辨率受到重组株系数数量限制的缺点^[33-34]。近年来, GWAS 在种子抗老化能力的分子机制研究上已得到广泛应用。

Renard 等^[35]对经自然老化和加速老化处理后的 270 个自然变异的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种质的种子进行 GWAS 分析,确定了多个与种子寿命相关的基因区域,在 Columbia 生态型中鉴定到 20 个与种子活力相关的候选基因,其中 7 个(*PSAD1*、*SSLEA*、*SSTPR*、*DHAR1*、*CYP86A8*、*MYB47* 和 *SPCH*)与种子寿命正相关,5 个(*RBOHD*、*RBOHE*、*RBOHF*、*KNAT7* 和 *SEP3*)与种子寿命负相关;且证明氧化胁迫相关的 *RBOHs* (NADPH 氧化酶基因)、*DHAR1* (脱氢抗坏血酸还原酶基因)和 *PSAD1* (光系统 I 亚基基因)在种子老化过程中扮演主要角色, *CYP86A8* (细胞色素 P-450 羟化酶基因)和转录因子基因(*MYB47*、*KNAT7* 和 *SEP3*)在种子老化过程中对种皮有保护作用。

通过 GWAS 分析,熊豆^[36]从 271 份水稻种质中共检测到 48 个种子贮藏耐性相关 SNPs,其中,3 个 SNPs 与人工老化处理相关联,45 个 SNPs 与自然老化相关联;同时,从其中两个 SNPs *dd110-00467* (Chr11_21953047)和 *id11008475* (Chr11_22-000109)的上、下游各 100 kb 区域内鉴定到控制水稻种子贮藏耐性的两个候选基因 *Os011g37640* 和 *Os011g37730*,它们在发芽率高的材料中的相对表达水平显著低于发芽率低的品种。Lee 等^[37]从 299 个籼稻种质中鉴定到与种子寿命相关的 8 个

候选基因(*Os03g51050*、*Os04g01160*、*Os04g01280*、*Os09g37250*、*Os11g01439*、*Os03g06890*、*Os03g069-00* 和 *Os03g03870*),它们主要参与 DNA 修复、转录、糖代谢、活性氧(reactive oxygen species, ROS)清除以及胚胎和根发育过程等。Wu 等^[38]从 456 个不同水稻种质中发现了 9 个新的 QTLs (*qSS1-1*、*qSS1-2*、*qSS2-1*、*qSS3-1*、*qSS5-1*、*qSS5-2*、*qSS7-1*、*qSS8-1* 和 *qSS11-1*),其中, *qSS1-2* 和 *qSS8-1* 分别与已报道的 *qSS1/OsGH3-2* 和 *OsPIMT1* 共定位;并发现这些 QTLs 可以很好地解释为何水稻籼亚种的种子的贮藏耐性优于粳亚种的种子。最近, Yuan 等^[39]通过对不同水稻种质的种子进行 GWAS 分析发现,吲哚-3-乙酸(IAA)-酰胺合成酶基因(*GRETCHEN HAGEN3-2*, *OsGH3-2*)是一个种子贮藏耐性相关基因, *OsGH3-2* 主要在发育的种子中表达并催化 IAA 与氨基酸结合,使其形成无活性的生长素; *OsGH3-2* 的过表达显著降低种子的贮藏耐性,而基因敲除或敲低增强种子的贮藏耐性; *OsGH3-2* 可能通过调节脱落酸(abscisic acid, ABA)信号途径作为种子贮藏耐性的负调节因子。Shi 等^[40]对 478 个不同水稻品种的种子在盐胁迫条件下的萌发相关性状进行 GWAS 分析,鉴定到 11 个与耐盐性显著相关的 QTLs,其中位于 Chr2 的一个 QTL 包含两个硝酸盐转运蛋白家族基因 *OsNRT2.1* 和 *OsNRT2.2*,其表达受到盐胁迫的影响。Magwaa 等^[41]对 350 个水稻 *indica japonica* 和 *Aus* 亚型品种的种子休眠特性进行 GWAS 分析,鉴定到 16 个 SNPs 与新鲜收获种子的萌发率相关联,38 个 SNPs 与后熟种子的萌发率相关联(其中 3 个也是存在于新鲜收获种子中的 SNPs);在新鲜收获种子中,有 3 个关联 SNPs 与 *GAIAA* 钝化基因 *GA2ox3*、*EUI1* 和 *GH3-2* 以及休眠基因 *Sdr4* 距离约 100 kb;在后熟种子中,有 1 个关联 SNP 毗邻 ABA 信号转导基因 *ABI5*。

胚芽鞘长的小麦品种对于深播种植有积极意义。然而,对 GA 不敏感的矮化基因 *Rht-B1b* 和 *Rht-D1b* 的广泛使用不利于培育具有胚芽鞘长的矮化小麦品种。Li 等^[42]对 893 个小麦品种进行 GWAS 分析,鉴定到 8 个胚芽鞘长度相关 QTLs (*QCL.stars-4DC1*、*QCL.stars-4BS1*、*QCL.stars-2DC1*、*QCL.stars-2DS1*、*QCL.stars-5BL1*、*QCL.stars-1BS1*、*QCL.stars-4BS2* 和 *QCL.stars-5B/5D*),且证明 *Rht-B1b* 和 *Rht-D1b* 的表达显著降低胚芽鞘长度。种子活力也影响幼苗的根系统建成(root system archi-

texture, RSA), 该性状对于农作物在胁迫条件下的水分和养分利用十分重要。Alemu 等^[43]对 192 个小麦品种进行 GWAS 分析, 鉴定到 38 个 RSA 相关 QTLs, 其中 4 个 QTLs (*EPdwRGA-6A*、*EPdwRDW-4A*、*EPdwiTGW-3B.1* 和 *EPdwIRW-5A*) 特别是 *EPdwRGA-6A* 可能对 RSA 起关键作用。

Nagel 等^[44]通过对 175 个大麦(*Hordeum vulgare*) 品种的种子进行 GWAS 分析, 发现了基因型、非生物和生物胁迫影响种子老化和寿命的 107 个标记性状关联(marker trait associations, MTAs); 未发现种子老化与脂溶性生育酚、油、淀粉和蛋白质含量之间存在相关性; 而长期干燥贮藏或人工老化处理的种子中, 水溶性谷胱甘肽和相关硫醇转化为二硫化物, 表明其细胞内变得更具氧化性; 不同贮藏和老化方式影响细胞内 pH 和生化过程进而导致种子老化; 此外, 种子响应老化处理或贮藏耐性似乎受到母本环境(maternal environment) 和遗传背景的显著影响。

Huang 等^[45]对 650 个燕麦(*Avena sativa*) 株系种子活力相关性状进行 GWAS 分析, 获得根、芽性状相关 QTLs 分别为 34 个和 16 个, 各对应于 41 个和 16 个 SNPs; 其中 5 个性状关联位点的序列与水稻、短柄草和玉米的同源序列匹配, 且 3 个性状关联位点的序列与种子活力相关的基因匹配, 分别是葡糖醛酸基转移酶基因(*Os01g067550-0*、*Bradi2g46410* 和 *Zm00001d043879*)、包含线粒体载体蛋白结构域的蛋白编码基因(*Os03g0191100*、*Bradi1g71800*、*Zm00001d048218* 和 *Zm00001d02-8008*) 和铁硫簇蛋白基因(*Os06g0146400d*、*Bradi-1g51010.1d* 和 *Zm00001d036145*)。

Upadhyaya 等^[46]对 242 份高粱(*Sorghum bicolour*) 种质进行 GWAS 分析, 发现 1 个 SNP 关联位点(Locus 7-2)与种子的低温发芽显著相关, 该位点与高粱耐寒性相关的 QTL *qSbCT07.10* 共定位^[47], 并鉴定到 1 个编码 CBL (calcineurin B-like protein)-互作蛋白激酶的候选基因(007G140900), 该基因与水稻 Chr8 上的耐冷性基因 *LOC_Os08g34240* 高度同源^[48-49], 其小麦同源基因(*TaCIPK14*) 在烟草中过表达时, 能提高烟草种子的耐寒性和发芽率^[50]。

通过 GWAS 分析, Tan 等^[51]从 520 个油菜(*Brassica napus*) 品种中鉴定到干旱和盐胁迫条件下 23 个 SNPs 关联位点与种子萌发率相关, 20 个 SNPs 关联位点与种子萌发指数相关, 其中, 位于 Chr_C08 的 SNP 关联位点与盐和干旱响应基因

BnaC08g41070 距离 3.32 kb, 位于 Chr_A4 的 SNP 关联位点与干旱响应基因 *BnaA04g02620D* 距离 2.20 kb, 位于 Chr_C06 的 SNP 关联位点与干旱响应基因 *BnaC06g01910D* 重叠; 此外, 还鉴定到 37 个与干旱和盐胁迫下种子萌发率或萌发指数相关的候选基因, 且这些候选基因大多数调节信号转导和脯氨酸生物合成, 或编码泛素连接酶(ubiquitin ligase) E3。Hatzig 等^[52]从 248 个油菜品种中鉴定到几个候选基因所在的基因组区间与种子萌发率、萌发速率、幼苗生长和千粒重等性状相关联, 且其中有些是拟南芥基因 *SCO1* (*SNOWY COTYLEDON 1*)、*ARR4* (*ARABIDOPSIS TWO-COMONENT RESPONSE REGULATOR 4*) 和 *ATE1* (*ARGINYLT-t-RNA PROTEIN TRANSFERASE 1*) 的同源基因。Luo 等^[53]基于 442 个油菜品种在低温和正常温度条件下的种子萌发和幼苗生长特性差异, 鉴定到 22 个与种子活力的低温胁迫耐性显著关联的 QTLs, 并从中筛选到 62 个候选基因, 这些基因的功能涉及 DNA 修复、RNA 翻译、线粒体激活和能量产生、蛋白质的泛素化和降解、抗氧化系统以及植物激素和信号转导等, 其中最值得关注的有 *BnaA03g40290D*、*BnaA06g07530D*、*BnaA0-9g06240D*、*BnaA09g06250D* 和 *BnaC02g10720D* 等。

2.2 多组学分析鉴定种子活力或抗老化能力相关基因及其代谢途径

种子活力或抗老化能力的多组学(multi-omics) 分析包括全基因组水平上的转录组学、蛋白质组学、降解组学和代谢组学分析等, 可全面鉴定相关基因及其代谢途径^[54]。

2.2.1 基因组学和蛋白质组学分析鉴定种子活力或抗老化能力相关基因及其代谢途径

迄今为止, 已有大量与种子活力相关的转录组学和蛋白质组学的研究报道。

Li 等^[55]通过对寿命长短不一的两个玉米株系的种子进行人工老化处理前后的转录组比较分析, 从差异表达基因中挖掘出 13 个可能与种子寿命相关的基因(*GRMZM2G058970*、*GRMZM2G3-02913*、*GRMZM2G358618*、*GRMZM2G375807*、*GRMZM2G379913*、*GRMZM2G379929*、*GRMZM2G43-8938*、*GRMZM5G867767*、*GRMZM2G181135*、*GRMZM5G800586*、*GRMZM5G877838*、*GRMZM2G07-4604* 和 *GRMZM5G824439*), 其中 11 个基因在 Chr3 上, 2 个基因在 Chr5 上, 10 个基因有注释信息。Gu 等^[56]对 20 个含油量不同的油菜品种种子进

行蛋白质组学和基因组学整合分析, 鉴定到 165 个差异蛋白质; 含油量高的种子具有较高的代谢活性, 尤其是含硫氨基酸代谢; 31 个特有基因在高含油量和低含油量种子的萌发过程中表现出显著差异, 其中 13 个基因(*BnaC-01g43710D*、*BnaC-06g19960D*、*BnaC06g20420D*、*BnaA07g20290D*、*BnaA07g20210D*、*BnaA06g16950D*、*BnaC04g42010D*、*BnaC06g09330D*、*BnaC03g70070D*、*BnaA07g33-310D*、*BnaC06g38200D*、*BnaC06g14990D* 和 *BnaC-06g14670D*)可能与种子萌发活力相关。

针对具有不同活力水平的拟南芥种子的比较蛋白质组学结果表明, 蛋白质合成能力、贮藏物质动员和细胞解毒作用相关蛋白质与种子活力密切相关^[57]。Catusse 等^[58]分别对吸水促萌和人工老化处理获得的不同活力的甜菜种子进行比较蛋白质组学分析, 发现有 18 个蛋白质在吸水促萌处理时上调, 老化处理时下调, 且老化处理后再经吸水促萌处理时又上调; 另有 11 个蛋白质则表现出相反的丰度变化。这些蛋白质涉及脂类和淀粉的动员、蛋白质合成或甲基循环等代谢途径, 乙醛酸酶、异柠檬酸裂解酶、蛋白质合成能力以及 ABA 信号途径等相关的蛋白质被认为可能是种子活力的主要参与者。杂交水稻和白杨种子的蛋白组学研究也发现, 能量代谢、细胞防御和修复相关蛋白质、贮藏蛋白、胚乳中与贮藏物代谢分解相关的酶、蛋白质合成与转运相关蛋白质等在种子人工老化后变化很明显, 特别是胚中的糖酵解相关酶类以及丙酮酸脱氢酶和乙醇脱氢酶在种子老化期间丰度显著增加, 暗示它们与种子活力变化有关^[59-60]。大豆种子的发育通常对高温和高湿敏感, Wei 等^[61]研究发现, 种子发育阶段对高温高湿耐性不同的两个品种在子叶、胚和叶中分别有 120、144 和 438 个丰度差异蛋白质, 这些蛋白质功能主要涉及信号转导、三羧酸循环、脂肪酸代谢、光合作用、蛋白质加工、折叠和组装、蛋白质生物合成或降解、植物-病原体相互作用、淀粉和蔗糖代谢以及氧化应激反应等代谢途径和细胞过程, 且高耐品种的细胞超微结构、上述代谢途径和生理生化变化较小。Chen 等^[62]对不同含水量的燕麦种子在不同温度条件下处理一定时间的蛋白质组和生理生化变化进行比较和关联分析, 获得 21 个丰度有显著差异的蛋白质, 其中包括随种子老化而下调的 19 个蛋白质和上调的 2 个蛋白质; 下调蛋白质中有 6 个热激蛋白(heat shock proteins,

HSPs)和 2 个 ATP 合酶, 参与碳水化合物和能量代谢、平衡其他蛋白质的合成与降解等; 上调蛋白质中有 1 个是精氨基琥珀酸合成酶(argininosuccinate synthase), 参与脯氨酸合成, 可维持细胞中 ROS 稳态, 对于种子的热胁迫抗性十分重要。另有研究表明, OsHSP18.2 (II 类胞质 HSP)是一个老化反应蛋白质, 在人工老化处理的水稻种子中丰度显著上调; OsHSP18.2 的转录产物在种子成熟后期显著增加, 在干种子中含量很高, 而在种子发芽后急剧减少。生化分析表明, OsHSP18.2 通过形成同源十二聚体, 作为分子伴侣发挥作用, 可防止柠檬酸合酶的热失活, 因此研究者认为 OsHSP18.2 可能通过限制 ROS 积累来保护和稳定细胞中酶的结构和功能, 使其免受不可逆损伤, 在种子成熟干燥、老化和萌发过程中, 提高种子活力、寿命和有利于幼苗建成^[63]。Wang 等^[64]研究了花生萌发种子胚轴不同部位脱水耐性及其蛋白质组学差异, 发现一些特殊的 LEA (late embryogenesis abundant)蛋白、脱水素(dehydrin)、钙调蛋白(calmodulin)、脂氧合酶 3 (LOX3)、ABA 响应蛋白以及脱毒反应相关蛋白质等的丰度与胚轴不同部位的脱水耐性高度相关。

miRNAs 也参与种子活力或抗老化能力的调控, 其中 miR164c 的表达与种子活力负相关, 而 miR168a 的表达与种子活力正相关^[65]。通过转录组学以及蛋白质组学差异分析和基因-蛋白质互作分析, 研究人员发现 miR164c 通过其靶基因 *PSK5* 和 *TIL1* 调控核心基因 *RPS27AA*, 后者通过其下游的六大类功能蛋白质, 包括胁迫响应、内质网蛋白加工、胚发育、丝氨酸内肽酶抑制剂、能量代谢和“其他”关联蛋白质, 共同调控水稻种子活力或抗老化能力^[66]。

2.2.2 代谢组学分析鉴定种子活力或抗老化能力相关的代谢标志物

代谢组学(metabonomics/metabolomics)分析指对生物体内所有代谢物进行定量分析, 以探讨代谢物与生物体生理病理变化的关系。近期, 该技术已被用于鉴定种子老化程度或种子寿命的代谢标志物(metabolic markers)。

种子引发(seed priming)是改善种子活力的重要措施。最近, 基于纳米材料的小尺寸和独特的物理化学特性, 纳米引发物开始应用于种子萌发特性的改良。比如, 使用洋葱(*Allium cepa*)提取物作为还原剂合成银、金纳米颗粒, 以及使用食品

工业副产品柑橘籽油和去除姜黄素后的姜黄油树脂制备纳米乳液,用于引发洋葱种子,可增加种子发芽率和出苗率;代谢组学研究表明,纳米材料引发处理后洋葱种子和幼苗中的 ABA 和顺式-(+)-12-氧代植物二烯酸(*cis*-(+)-12-oxo-phyto-dienoic acid)的产生受到显著抑制,萌发促进物如 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid)和玉米素(zeatin)的含量则增加^[67]。适当浓度的激动素处理苜蓿(*Medicago truncatula*)种子可加速其萌发,但会伤害幼苗生长。采用非靶向代谢组学(non-targeted metabolomics)分析经水和 0.5 mmol/L 激动素分别浸泡 2 h 和 8 h 的苜蓿种子以及胚根伸出阶段种子中的代谢物组成,结果表明,无论是水或激动素浸泡处理,五磷酸肌醇、胍丁胺、二半乳糖基甘油、六磷酸肌醇和油酰胆碱等是 3 个不同处理的种子中主要的差异代谢物;27 种代谢物的平均相对含量在激动素与水处理之间形成显著差异,但仅发生在胚根伸出阶段;这些代谢物消耗可能与种子更快的发芽有关;较长时间暴露于激动素引起的 DNA 损伤或基因毒性损伤(genotoxic injury)可能是激动素伤害幼苗生长的原因^[68]。

Chen 等^[69]对来自 4 个不育系和 4 个恢复系的 16 个杂交水稻组合的种子进行人工老化和自然老化处理后的代谢组学分析,共鉴定出 56 个代谢物,其中大多数与初级代谢有关;在种子老化过程中,半乳糖、葡萄糖酸、果糖和甘油的含量显著增加;绝对定量结果表明,在不同老化处理下,半乳糖和葡萄糖酸与种子的发芽率极显著负相关;棉子糖的相对含量在种子贮藏过程中变化不大,但与人工老化种子的发芽率显著正相关。Min 等^[70]将正常组和人工老化组人参种子均用赤霉素处理后,使用气相色谱-质谱(GC-MS)分析比较两组样品之间的代谢物变化,确定了 44 种内源性代谢物,其中 9 种含量呈显著差异的代谢物可作为预测人参种子寿命的潜在标志物。

2.2.3 降解组学分析鉴定种子活力或抗老化能力相关的 miRNAs 及其靶基因

降解组测序(degradome sequencing)主要针对 miRNA 介导的 mRNA 剪切片段进行测序,从而筛选 miRNA 作用的靶基因。降解组学分析已用于鉴定与种子活力或抗老化相关 miRNAs 及其靶基因。Gong 等^[71]分别对正常的和人工老化处理 2 d 的玉米种子进行 miRNA 测序,共发现 27 个差异表达的 miRNAs,其中 10 个被 RT-qPCR 证实;降

解组测序共鉴定到 1 142 个可能被 131 个 miRNAs 切割的靶转录本,其中 9 个差异表达的 miRNAs 的 26 个靶基因可能在种子活力调控中发挥作用。Huang 等^[72]分别对二倍体水稻和四倍体水稻的种子进行老化处理,结果表明,四倍体水稻种子的抗老化能力强于二倍体水稻种子。降解组测序发现, Osa-miR164d 的靶基因转录本的降解片段只在四倍体水稻种子中检测到,推测 Osa-miR164d 可能通过调控靶基因的差异表达参与调控水稻种子抗老化能力,该结果与本研究室关于 miR164c 调控水稻种子活力的作用机制^[65-66]一致。

3 种子活力或抗老化相关基因的功能及其分子作用机制研究

基因编辑技术是研究基因生物学功能的主要手段,包括过表达(overexpression)转基因技术、基因敲除或敲减技术(knockout/knockdown)、基因沉默(RNAi)技术等^[73-75]。这些技术在种子活力或抗老化能力相关基因的功能及其分子作用机制研究中发挥了重要作用。

3.1 活性氧毒性清除相关基因的功能及其分子作用机制

种子在脱水、贮藏和萌发过程中,不断地产生有毒副产品 ROS,导致种子劣变以致寿命下降。ROS 的毒性源于其不加区别地与细胞中几乎所有组分如脂质、蛋白质和 DNA 等发生反应。由 ROS 引起的基因组伤害被认为是种子老化的重要原因之一,如引起 DNA 中形成 7,8-二氢-8-氧鸟嘌呤(7,8-dihydro-8-oxoguanine, 8-oxo-G),该产物在 DNA 复制过程中与腺嘌呤而不是胞嘧啶形成碱基对,从而导致 GC→TA 颠换。有研究表明,拟南芥中的 AtOGG1 参与碱基切除修复,清除 DNA 中的 8-oxo-G。AtOGG1 的转录本在种子干燥和萌发吸水过程中显著上调,同时在转基因种子中 8-oxo-G 含量下降,提示过表达该基因增强了种子的非生物胁迫耐性,延缓老化,进而延长种子寿命^[76]。另外,在许多植物中,1-Cys 过氧化物酶(1-cys peroxidase, 1-Cys Prx, 也称为 PER1)是一类种子专一性抗氧化剂,可保护半胱氨酸残基免受 ROS 的伤害。Chen 等^[77]从荷花(*Nelumbo nucifera* Gaertn)种子中鉴定和表征了 NnPER1 蛋白, NnPER1 能够保护 DNA 免受 ROS 的切割, NnPER1 的转录和蛋白质积累在种子干燥、吸水以及非生物胁迫处理期间增加; NnPER1 在拟南芥中的异

位表达可提高拟南芥种子的寿命和抗老化能力,且转基因种子中 ROS 和脂质过氧化水平显著低于野生型种子。

3.2 脂氧合酶基因的功能及其分子作用机制

膜脂的过氧化和自由基的增殖是种子活力下降的两个重要原因^[10]。脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)是催化不饱和脂肪酸代谢的关键酶之一,随着 LOX 活性的增加,不饱和脂肪酸的水平降低,脂肪酸被氧化,形成自由基,然后种子迅速变质^[14]。LOX 家族的一些成员在种子萌发过程中起到降解脂质的作用。在种子贮藏过程中,由于 LOX 活性增强,不饱和脂肪酸发生过氧化反应,会直接导致种子活力降低和谷物营养品质变差,因此 LOX 与种子寿命和抗老化能力关系密切,通过 RNAi 技术降低种子中 LOX 活性可以提高种子的抗老化能力^[78]。比如,与野生型相比,过表达 *OsLOX2* 水稻株系的种子在正常条件下萌发加速,贮藏过程中种子加速老化,活力加速降低;而 *OsLOX2* 的 RNAi 导致种子发芽延迟和寿命延长,但 *OsLOX2* 活性受到强烈抑制的 RNAi 株系的种子在加速老化后完全失去发芽能力,因此若既要影响正常条件下种子发芽,又能延缓贮藏中种子的老化进程,适当抑制 *OsLOX2* 的表达可能是必要的^[79]。另有研究报道,缺失脂氧合酶 LOX3 的水稻种子在贮藏过程中的抗老化能力比 LOX3 正常的水稻种子强;*OsLOX3* 反义构建体的转基因水稻种子的胚乳中 *OsLOX3* 表达下调、*OsLOX* mRNA 水平显著降低,LOX3 的活性即将亚油酸转化为 9-氢过氧十八碳二烯酸(9-hydroperoxyoctadecadienoic acid, 9-HPOD)的能力显著低于野生型种子,该转基因植株表型和生命周期正常,但种子的贮藏耐性得到改善^[80]。

3.3 乙醛脱氢酶基因和醛-酮还原酶基因的功能及其分子作用机制

水稻的乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase 7, OsALDH7)可能通过解毒脂质过氧化产生的醛,从而维持种子活力。*OsALDH7* 的 T-DNA 插入突变体受非生物胁迫显著影响,突变体种子在干燥和贮藏过程中,胚乳有类黑素(melanoidin)积累;与野生型相比,突变体种子对人工老化处理更敏感,并且积累更多的丙二醛^[81]。在种子贮藏过程中脂质过氧化介导产生的还原性羰基化合物(reactive carbonyl compounds, RCC)也是细胞毒性物质之一,其积累会降低种子活力。醛酮还原酶(aldo-ke-

toreductase, AKR1)对 RCC 的解毒作用能够延长种子寿命,AKR1 过表达的水稻和烟草种子的抗老化能力明显高于野生型^[82]。

3.4 L-异戊烯基甲基转移酶基因的功能及其分子作用机制

非生物胁迫会加速细胞内蛋白质中异天冬氨酰(isoAsp)残基的形成,从而影响蛋白质结构和功能。L-异戊烯基甲基转移酶(protein L-isoaspartyl methyltransferase, PIMT)通过将有害的 isoAsp 残基恢复为功能性天冬氨酰残基来修复其他蛋白质^[83]。该酶在植物中有两个不同的编码基因—*PIMT1* 和 *PIMT2*。早在 1993 年,即有报道 PIMT 可能与小麦种子的生活力有关^[84]。拟南芥种子中 *PIMT1* 含量增加可降低蛋白质中 isoAsp 残基的积累,使种子寿命延长和活力提高;相反,*PIMT1* 含量减少时,新鲜的干燥成熟种子的蛋白质中 isoAsp 残基的积累量增加,导致种子对老化处理的敏感性提高和在胁迫发芽条件下种子活力丧失^[85]。不同 PIMT 亚型的生化活性有差异,在发育、成熟以及暂时静止状态的正常水稻种子中高活性 PIMT 是必需的^[86]。Wei 等^[87]从水稻中克隆到两个 *PIMT* 基因——*OsPIMT1* 和 *OsPIMT2*,翻译产物 *OsPIMT2* 主要存在于绿色组织的叶绿体和细胞核中,而 *OsPIMT1* 在种子胚中大量积累;*OsPIMT1* 突变株系的种子对人工老化高度敏感,而过表达株系的种子中减少了 isoAsp 残基的积累,种子活力增强,人工老化 21 d 的过表达株系种子的发芽率与野生型相比提高 9%~15%;来自 *OsPIMT1* RNAi 株系的种子在胚中过度积累 isoAsp 残基,种子发芽能力快速丧失。同样,人工老化处理后的鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)种子发芽率显著降低,种子中 *CaPIMT* 活性也降低;进一步研究表明,*CaPIMT2* 可使核蛋白中的异常 isoAsp 残基得到修复,而 *CaPIMT1* 主要在细胞质部分修复此类异常蛋白质,从而增强种子活力和寿命^[88]。

3.5 生育酚(维生素 E)基因的功能及其分子作用机制

生育酚(tocopherols 或 vitamin E, 维生素 E)是植物合成的一类亲脂性抗氧化剂,在种子中含量特别高。Simontacch 等^[89]发现大豆胚轴中 α -tocopherol 含量随种子所处的外界氧化胁迫条件而发生变化,高活力或抗氧化能力强的种子中 α -tocopherol 含量也高。Sattler 等^[90]在拟南芥中分离并表征了两个维生素 E 基因(*VTE1* 和 *VTE2*),这两个基

因的突变都会导致组织中生育酚缺乏;但两者作用机制有区别, *vte1* 破坏生育酚环化酶活性并积累氧化还原生物合成中间产物, 而 *vte2* 破坏尿黑酸植基转移酶(homogentisate phytyltransferase)的活性, 不积累中间产物;与野生型相比, 这两个基因中任何一个突变均会导致种子寿命大大降低。

3.6 金属硫蛋白基因和热激蛋白基因的功能及其分子作用机制

金属硫蛋白(metallothioneins, MTs)是一类能够结合金属离子的低相对分子质量、富含半胱氨酸的蛋白质, 主要参与生物体内重金属离子的稳态维持和活性氧的清除反应。在植物中, HSPs 极其丰富和多样, 并且与多种非生物胁迫逆境有关。周玉亮^[91]研究莲 MTs 和 HSPs 的生物学功能时发现, 过表达 *NnMT2a*、*NnMT3* 或 *NnHSP17.5* 的拟南芥种子与野生型种子相比表现出更强的抵抗人工老化的能力。Yuan 等^[92]研究发现, 在水稻中, *Os-MT2b* (*MET-ALLOTHIONEIN2b*)优先在水稻未成熟穗、萌发胚的盾片和侧根原基中表达, 且细胞分裂素下调其表达;在 *OsM-T2b* 过表达和 RNAi 转基因植株中, 内源细胞分裂素——异戊烯基腺苷(isopentenyladenosine)的含量差异表明, *OsMT2b* 可能通过反馈调节内源细胞分裂素水平而参与水稻根发育和种子胚萌发的调控。

4 展望

在贮藏过程中, 种子老化或活力下降是不可避免的, 每年农作物种子因老化而给农业生产造成巨大损失^[93]。近十多年来, 分子生物学技术应用于种子活力或抗老化能力领域的研究, 取得了显著进展, 越来越多的种子抗老化相关基因得到发掘和克隆。对这些基因的生物学功能、基因之间的相互作用及其分子调控机制的研究, 将有助于阐明种子活力或抗老化能力的分子调控机制;在分子设计育种中, 通过基因编辑技术对获得的优良基因进行整合和开发利用, 可望培育出种子抗老化的农作物新品种, 从而确保种质资源的长期保存, 以及满足农业生产对高质量种子的需求。

参考文献(References):

- [1] 刘旭, 李立会, 黎裕, 等. 作物种质资源研究回顾与发展趋势[J]. 农学报(LIU Xu, LI Li-hui, LI Yu, et al. Crop germplasm resources: advances and trends[J]. Journal of Agriculture), 2018, 8(1): 10-15.
- [2] Food and Agriculture Organization. Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture[M]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013: 1-16.
- [3] SHABAN M. Review on physiological aspects of seed deterioration[J]. International Journal of Agriculture and Crop Science, 2013, 6(11): 627-631.
- [4] MCDONALD M B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment[J]. Seed Science and Technology, 1999, 27(1): 177-237.
- [5] ARC E, OGÉ L, GRAPPIN P, et al. Plant seed: a relevant model to study aging processes[M]//OLGUN A. The Field of Biological Aging: Past, Present and Future. Trivandrum: Transworld Research Network, 2011: 87-102.
- [6] SANO N, RAJJOU L, NORTH H M, et al. Staying alive: molecular aspects of seed longevity[J]. Plant and Cell Physiology, 2016, 57(4): 660-674.
- [7] ABDUL BAKI A A. Biochemical aspects of seed vigor[J]. Hort-Science, 1980, 15(6): 765-771.
- [8] BEWLEY J D, BRADFORD K J, HILHORST H W M, et al. Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy[M]. 3rd ed. New York: Springer, 2013.
- [9] WOJTYLA Ł, LECHOWSKA K, KUBALA S, et al. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 66.
- [10] 孙群, 王建华, 孙宝启. 种子活力的生理和遗传机理研究进展[J]. 中国农业科学(SUN Qun, WANG Jian-hua, SUN Bao-qi. Advances on seed vigor physiological and genetic mechanisms[J]. Scientia Agricultura Sinica), 2007, 40(1): 48-53.
- [11] MIURA K, LIN S, YANO M, et al. Mapping quantitative trait loci controlling seed longevity in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104(6): 981-986.
- [12] CLERKX E J M, BLANKESTIJN-DE VRIES H, RUYLS G J, et al. Genetic differences in seed longevity of various *Arabidopsis* mutants[J]. Physiologia Plantarum, 2004, 121(3): 448-461.
- [13] NAGEL M, ROSENHAUER M, WILLNER E, et al. Seed longevity in oilseed rape (*Brassica napus* L.)—genetic variation and QTL mapping[J]. Plant Genetic Resources, 2011, 9(2): 260-263.
- [14] NAGEL M, KODDE J, PISTRICK S, et al. Barley seed aging: genetics behind the dry elevated pressure of oxygen aging and moist controlled deterioration[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 388.
- [15] ARIF M A R, NAGEL M, LOHWASSER U, et al. Genetic architecture of seed longevity in bread wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Journal of Biosciences, 2017, 42(1): 81-89.
- [16] TANKSLEY S D. Mapping polygenes[J]. Annual Review of Genetics, 1993, 27: 205-233.
- [17] LU C, LIU J, JIANG J H, et al. Development and application of SCAR markers for discriminating cytoplasmic male sterile lines from their cognate maintainer lines in *indica* rice[J]. Rice Science, 2013, 20(3): 191-199.
- [18] LI C S, SHAO G S, WANG L, et al. QTL identification and fine mapping for seed storability in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Euphytica, 2017, 213(6): 127.
- [19] XIE L X, TAN Z W, ZHOU Y, et al. Identification and fine mapping of quantitative trait loci for seed vigor in germination and seedling establishment in rice[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2014, 56(8): 749-759.
- [20] ABE A, TAKAGI H, FUJIBE T, et al. *OsGA20ox1*, a candidate gene for a major QTL controlling seedling vigor in rice[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 125(4): 647-657.
- [21] JIN J, LONG W X, WANG L T, et al. QTL mapping of seed vigor of backcross inbred lines derived from *Oryza longistaminata* under artificial aging[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1909.
- [22] SASAKI K, FUKUTA Y, SATO T. Mapping of quantitative trait loci controlling seed longevity of rice (*Oryza sativa* L.) after various periods of seed storage[J]. Plant Breeding, 2005, 124(4): 361-366.
- [23] JIANG W Z, LEE J, JIN Y M, et al. Identification of QTLs for seed germination capability after various storage periods using two RIL populations in rice[J]. Molecules and Cells, 2011, 31(4): 385-392.

- [24] LI L F, LIN Q Y, LIU S J, *et al.* Identification of quantitative trait loci for seed storability in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Plant Breeding, 2012, 131(6): 739–743.
- [25] ZENG D L, GUO L B, XU Y B, *et al.* QTL analysis of seed storability in rice[J]. Plant Breeding, 2006, 125(1): 57–60.
- [26] XUE Y, ZHANG S Q, YAO Q H, *et al.* Identification of quantitative trait loci for seed storability in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Euphytica, 2008, 164(3): 739–744.
- [27] LIN Q Y, WANG W Y, REN Y K, *et al.* Genetic dissection of seed storability using two different populations with a same parent rice cultivar N22[J]. Breeding Science, 2015, 65(5): 411–419.
- [28] HANG N T, LIN Q Y, LIU L L, *et al.* Mapping QTLs related to rice seed storability under natural and artificial aging storage conditions[J]. Euphytica, 2015, 203(3): 673–681.
- [29] YUAN Z Y, FAN K, XIA L F, *et al.* Genetic dissection of seed storability and validation of candidate gene associated with antioxidant capability in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(18): 4442.
- [30] SHI H W, GUAN W H, SHI Y G, *et al.* QTL mapping and candidate gene analysis of seed vigor-related traits during artificial aging in wheat (*Triticum aestivum*)[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 22060.
- [31] HAN Z P, KU L X, ZHANG Z Z, *et al.* QTLs for seed vigor-related traits identified in maize seeds germinated under artificial aging conditions[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92535.
- [32] ZHANG X, HINA A, SONG S Y, *et al.* Whole-genome mapping identified novel “QTL hotspots regions” for seed storability in soybean (*Glycine max* L.)[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 499.
- [33] HUANG X H, HAN B. Natural variations and genome-wide association studies in crop plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2014, 65: 531–551.
- [34] KORTE A, FARLOW A. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review[J]. Plant Methods, 2013, 9: 29.
- [35] RENARD J, NIÑOLES R, MARTÍNEZ-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[J]. Plant, Cell & Environment, 2020, 43(10): 2523–2539.
- [36] 熊豆. 水稻种子耐贮性全基因组关联分析[D]. 长沙: 湖南农业大学(XIONG Dou. Genome-wide Association Study of Rice Seed Storability[D]. Changsha: Hunan Agricultural University), 2019.
- [37] LEE J S, VELASCO-PUNZALAN M, PACLEB M, *et al.* Variation in seed longevity among diverse *Indica* rice varieties[J]. Annals of Botany, 2019, 124(3): 447–460.
- [38] WU F X, LUO X, WANG L Q, *et al.* Genome-wide association study reveals the QTLs for seed storability in world rice core collections[J]. Plants, 2021, 10(4): 812.
- [39] YUAN Z Y, FAN K, WANG Y T, *et al.* *OsGRETCHENHA-GEN3-2* modulates rice seed storability via accumulation of abscisic acid and protective substances[J]. Plant Physiology, 2021, 186(1): 469–482.
- [40] SHI Y Y, GAO L L, WU Z C, *et al.* Genome-wide association study of salt tolerance at the seed germination stage in rice[J]. BMC Plant Biology, 2017, 17(1): 92.
- [41] MAGWA R A, ZHAO H, XING Y Z. Genome-wide association mapping revealed a diverse genetic basis of seed dormancy across subpopulations in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. BMC Genetics, 2016, 17: 28.
- [42] LI G Q, BAI G H, CARVER B F, *et al.* Genome-wide association study reveals genetic architecture of coleoptile length in wheat[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2017, 130(2): 391–401.
- [43] ALEMU A, FEYISSA T, MACCAFERRI M, *et al.* Genome-wide association analysis unveils novel QTLs for seminal root system architecture traits in Ethiopian durum wheat[J]. BMC Genomics, 2021, 22(1): 20.
- [44] NAGEL M, KRANNER I, NEUMANN K, *et al.* Genome-wide association mapping and biochemical markers reveal that seed ageing and longevity are intricately affected by genetic background and developmental and environmental conditions in barley[J]. Plant, Cell & Environment, 2015, 38(6): 1011–1022.
- [45] HUANG C T, KLOS K E, HUANG Y F. Genome-wide association study reveals the genetic architecture of seed vigor in oats[J]. G3, 2020, 10(12): 4489–4503.
- [46] UPADHYAYA H D, WANG Y H, SASTRY D V S S R, *et al.* Association mapping of germinability and seedling vigor in sorghum under controlled low-temperature conditions[J]. Genome, 2016, 59(2): 137–145.
- [47] MARLA S R, BUROW G, CHOPRA R, *et al.* Genetic architecture of chilling tolerance in sorghum dissected with a nested association mapping population[J]. G3, 2019, 9(12): 4045–4057.
- [48] ANDAYA V C, MACKILL D J. Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice[J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(392): 2579–2585.
- [49] YANG Z M, HUANG D Q, TANG W Q, *et al.* Mapping of quantitative trait loci underlying cold tolerance in rice seedlings via high-throughput sequencing of pooled extremes[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68433.
- [50] DENG X M, ZHOU S Y, HU W, *et al.* Ectopic expression of wheat *TaCIPK14*, encoding a calcineurin B-like protein-interacting protein kinase, confers salinity and cold tolerance in tobacco[J]. Physiologia Plantarum, 2013, 149(3): 367–377.
- [51] TAN M, LIAO F, HOU L T, *et al.* Genome-wide association analysis of seed germination percentage and germination index in *Brassica napus* L. under salt and drought stresses[J]. Euphytica, 2017, 213(2): 40.
- [52] HATZIG S V, FRISCH M, BREUER F, *et al.* Genome-wide association mapping unravels the genetic control of seed germination and vigor in *Brassica napus*[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 221.
- [53] LUO T, ZHANG Y T, ZHANG C N, *et al.* Genome-wide association mapping unravels the genetic control of seed vigor under low-temperature conditions in rapeseed (*Brassica napus* L.)[J]. Plants, 2021, 10(3): 426.
- [54] RAJJOU L, DUVAL M, GALLARDO K, *et al.* Seed germination and vigor[J]. Annual Review of Plant Biology, 2012, 63: 507–533.
- [55] LI L, WANG F, LI X H, *et al.* Comparative analysis of the accelerated aged seed transcriptome profiles of two maize chromosome segment substitution lines[J]. PLoS One, 2019, 14(11): e0216977.
- [56] 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[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 21.
- [57] RAJJOU L, LOVIGNY Y, GROOT S P C, *et al.* Proteome-wide characterization of seed aging in *Arabidopsis*: a comparison between artificial and natural aging protocols[J]. Plant Physiology, 2008, 148(1): 620–641.
- [58] CATUSSE J, MEINHARD J, JOB C, *et al.* Proteomics reveals potential biomarkers of seed vigor in sugarbeet[J]. Proteomics, 2011, 11(9): 1569–1580.
- [59] ZHANG Y X, XU H H, LIU S J, *et al.* Proteomic analysis reveals different involvement of embryo and endosperm proteins during aging of Yliangyou 2 hybrid rice seeds[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1394.
- [60] ZHANG H, WANG W Q, LIU S J, *et al.* Proteome analysis of poplar seed vigor[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0132509.
- [61] WEI J P, LIU X L, LI L Z, *et al.* Quantitative proteomic, physiological and biochemical analysis of cotyledon, embryo, leaf and pod reveals the effects of high temperature and humidity stress on seed vigor formation in soybean[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 127.

- [62] CHEN L L, CHEN Q Z, KONG L Q, *et al.* Proteomic and physiological analysis of the response of oat (*Avena sativa*) seeds to heat stress under different moisture conditions[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 896.
- [63] KAUR H, PETLA B P, KAMBLE N U, *et al.* Differentially expressed seed aging responsive heat shock protein *OsHSP18.2* implicates in seed vigor, longevity and improves germination and seedling establishment under abiotic stress[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 713.
- [64] WANG W Q, WANG Y, SONG X J, *et al.* Proteomic analysis of desiccation tolerance and its re-establishment in different embryo axis tissues of germinated pea seeds[J]. *Journal of Proteome Research*, 2021, 20(5): 2352–2363.
- [65] ZHOU Y, ZHOU S Q, WANG L P, *et al.* MiR164c and miR168a regulate seed vigor in rice[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020, 62(4): 470–486.
- [66] HUANG K R, ZHOU S Q, SHEN K M, *et al.* Elucidation of the miR164c-guided gene/protein interaction network controlling seed vigor in rice[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 589005.
- [67] ACHARYA P, JAYAPRAKASHA G K, SEMPER J, *et al.* ¹H nuclear magnetic resonance and liquid chromatography coupled with mass spectrometry-based metabolomics reveal enhancement of growth-promoting metabolites in onion seedlings treated with green-synthesized nanomaterials[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(46): 13206–13220.
- [68] ARAÚJO S, PAGANO A, DONDI D, *et al.* Metabolic signatures of germination triggered by kinetin in *Medicago truncatula*[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 10466.
- [69] CHEN B X, GAO J D, YAN S J, *et al.* Identification of metabolomic biomarkers of seed vigor and aging in hybrid rice[J]. *Research Square*, 2021: 1–22. (2021–04–20) <https://www.researchsquare.com/article/rs-417934/v1>. DOI: 10.21203/rs.3.rs-417934/v1.
- [70] MIN J E, HONG J Y, KWON S W, *et al.* Integrated metabolomics signature for assessing the longevity of *Panax ginseng* seeds[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(13): 6089–6096.
- [71] GONG S M, DING Y F, HUANG S X, *et al.* Identification of miRNAs and their target genes associated with sweet corn Seed vigor by combined small RNA and degradome sequencing[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(22): 5485–5491.
- [72] HUANG B S, GAN L, CHEN D J, *et al.* Integration of small RNA, degradome and proteome sequencing in *Oryza sativa* reveals a delayed senescence network in tetraploid rice seed[J]. *PLoS One*, 2020, 15(11): e0242260.
- [73] WEN J Q, LEASE K A, WALKER J C. DVL, a novel class of small polypeptides: overexpression alters *Arabidopsis* development[J]. *The Plant Journal*, 2004, 37(5): 668–677.
- [74] FARHAT S, JAIN N, SINGH N, *et al.* CRISPR-Cas9 directed genome engineering for enhancing salt stress tolerance in rice[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2019, 96: 91–99.
- [75] ALI N, DATTA S K, DATTA K. RNA interference in designing transgenic crops[J]. *GM Crops*, 2010, 1(4): 207–213.
- [76] CHEN H H, CHU P, ZHOU Y L, *et al.* Overexpression of AtOGG1, a DNA glycosylase/AP lyase, enhances seed longevity and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(11): 4107–4121.
- [77] CHEN H H, CHU P, ZHOU Y L, *et al.* Ectopic expression of NnPER1, a *Nelumbo nucifera* 1-cysteine peroxiredoxin antioxidant, enhances seed longevity and stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2016, 88(4): 608–619.
- [78] GAYEN D, ALI N, GANGULY M, *et al.* RNAi mediated silencing of *lipxygenase* gene to maintain rice grain quality and viability during storage[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2014, 118(2): 229–243.
- [79] HUANG J X, CAI M H, LONG Q Z, *et al.* *OsLOX2*, a rice type I *lipxygenase*, confers opposite effects on seed germination and longevity[J]. *Transgenic Research*, 2014, 23(4): 643–655.
- [80] XU H B, WEI Y D, ZHU Y S, *et al.* Antisense suppression of *LOX3* gene expression in rice endosperm enhances seed longevity[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13(4): 526–539.
- [81] SHIN J H, KIM S R, AN G. Rice aldehyde dehydrogenase7 is needed for seed maturation and viability[J]. *Plant Physiology*, 2009, 149(2): 905–915.
- [82] NISARGA K N, VEMANNA R S, KODEKALLU CHANDRA-SHEKAR B, *et al.* *Aldo-ketoreductase 1 (AKR1)* improves seed longevity in tobacco and rice by detoxifying reactive cytotoxic compounds generated during ageing[J]. *Rice*, 2017, 10(1): 11.
- [83] GHOSH S, KAMBLE N U, VERMA P, *et al.* *Arabidopsis* protein L-isoaspartyl methyltransferase repairs isoaspartyl damage to antioxidant enzymes and increases heat and oxidative stress tolerance[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(3): 783–799.
- [84] MUDGETT M B, CLARKE S. Characterization of plant L-isoaspartyl methyltransferases that may be involved in seed survival: purification, cloning, and sequence analysis of the wheat germ enzyme[J]. *Biochemistry*, 1993, 32(41): 11100–11111.
- [85] OGÉ L, BOURDAIS G, BOVE J, *et al.* *Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase 1* is involved in both seed longevity and germination vigor in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(11): 3022–3037.
- [86] PETLA B P, KAMBLE N U, KUMAR M, *et al.* Rice protein L-isoaspartyl methyltransferase isoforms differentially accumulate during seed maturation to restrict deleterious isoAsp and reactive oxygen species accumulation and are implicated in seed vigor and longevity[J]. *New Phytologist*, 2016, 211(2): 627–645.
- [87] WEI Y D, XU H B, DIAO L R, *et al.* Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase 1 (PIMT1) in rice improves seed longevity by preserving embryo vigor and viability[J]. *Plant Molecular Biology*, 2015, 89(4/5): 475–492.
- [88] VERMA P, KAUR H, PETLA B P, *et al.* Protein L-isoaspartyl methyltransferase2 is differentially expressed in chickpea and enhances seed vigor and longevity by reducing abnormal isoaspartyl accumulation predominantly in seed nuclear proteins[J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(3): 1141–1157.
- [89] SIMONTACCH I M, CARO A, FRAGA C G, *et al.* Oxidative stress affects [alpha]-tocopherol content in soybean embryonic axes upon imbibition and following germination[J]. *Plant Physiology*, 1993, 103(3): 949–953.
- [90] SATTLER S E, GILLILAND L U, MAGALLANES-LUNDBACK M, *et al.* Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(6): 1419–1432.
- [91] 周玉亮. 莲金属硫蛋白和热激蛋白基因在种子活力中的功能分析[D]. 广州: 中山大学(ZHOU Yu-liang. Function Analysis of *Nelumbo nucifera* Metallothionein and Heat Shock Protein Genes in Seed Vigor[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University), 2011.
- [92] YUAN J, CHEN D, REN Y J, *et al.* Characteristic and expression analysis of a metallothionein gene, *OsMT2b*, down-regulated by cytokinin suggests functions in root development and seed embryo germination of rice[J]. *Plant Physiology*, 2008, 146(4): 1637–1650.
- [93] 程航, 陈玲玲, 夏方山, 等. 种子老化的分子生物学研究[J]. 草业科学(CHENG Hang, CHEN Ling-ling, XIA Fang-shan, *et al.* Advances in the molecular biology study of seed aging[J]. *Practical Science*), 2017, 34(1): 129–137.