

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.05.001

引用格式:李若鸿,赵士强,彭梦祝,等.贮藏不同年份紫花苜蓿种子吸胀萌发过程中的抗氧化生理响应[J].草地学报,2026,34(5):1557—1567

LI Ruo-hong, ZHAO Shi-qiang, PENG Meng-zhu, et al. Antioxidant Physiological Responses during Imbibition and Germination of Alfalfa Seeds Stored for Different Years[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(5):1557—1567

贮藏不同年份紫花苜蓿种子吸胀萌发过程中的 抗氧化生理响应

李若鸿, 赵士强, 彭梦祝, 毛培胜*

(中国农业大学草业科学与技术学院, 北京 100193)

摘要:为探究自然老化紫花苜蓿(*Medicago sativa*)种子吸胀萌发过程中抗氧化生理调控机制,本试验以贮藏4 a和7 a的‘中苜1号’‘中苜2号’紫花苜蓿种子为试验对象,测定吸胀不同阶段种子发芽特性、抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环中抗氧化酶活性和抗氧化物含量,分析贮藏种子抗氧化各指标变化规律。结果表明:贮藏7 a会显著降低紫花苜蓿种子的发芽能力,具体表现为发芽势、发芽率、发芽指数、活力指数和幼苗根长下降。贮藏年限对种子初期吸水速率影响不大,但影响了吸胀阶段进程,随着贮藏时间的延长,紫花苜蓿种子的吸胀过程中吸水滞缓期延长。自然老化会导致种子吸胀期间AsA-GSH循环功能衰退,相较于贮藏4 a的种子,贮藏7 a的紫花苜蓿种子,吸胀过程中过氧化氢酶(Catalase, CAT)、谷胱甘肽还原酶(Glutathione reductase, GR)和单脱氢抗坏血酸还原酶(Monodehydroascorbate reductase, MDHAR)活性显著降低,抗坏血酸(Ascorbic acid, AsA)和谷胱甘肽(Glutathione, GSH)含量减少,氧化型谷胱甘肽(Oxidized glutathione, GSSG)积累,表明活性氧(Reactive oxygen species, ROS)清除能力减弱,膜脂过氧化加剧。贮藏4 a的种子在吸胀中后期通过过氧化物酶(Peroxidase, POD)和GR等活性上调,一定程度上延缓了ROS的过量积累,表现出更强的抗氧化能力。隶属函数法表明,紫花苜蓿种子萌发能力排序为:‘中苜1号’4 a>‘中苜2号’4 a>‘中苜1号’7 a>‘中苜2号’7 a,相较于‘中苜2号’种子,在自然老化过程中‘中苜1号’表现出相对稳定的活力和生理状态,具有较强的耐贮性。

关键词:紫花苜蓿种子;贮藏年限;AsA-GSH循环;种子活力

中图分类号:S541.9

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)05-1557-11

Antioxidant Physiological Responses during Imbibition and Germination of Alfalfa Seeds Stored for Different Years

LI Ruo-hong, ZHAO Shi-qiang, PENG Meng-zhu, MAO Pei-sheng*

(College of Grassland Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: To investigate the antioxidant physiological regulatory mechanisms during the germination of naturally aged alfalfa (*Medicago sativa*) seeds, this experiment used ‘Zhongmu No. 1’ and ‘Zhongmu No. 2’ alfalfa seeds stored for 4 and 7 years, respectively, as experimental materials. After being imbibed at different stages, seed germination indices, antioxidant enzyme activities of the ascorbic acid-glutathione (AsA-GSH) cycle, and antioxidant contents were measured to analyze the changes in antioxidant indices of alfalfa seeds during storage. The main results are as follows: storage for 7 years significantly reduced the germination capacity of alfalfa seeds, specifically manifested by decreases in germination potential, germination rate, germination index, vitality index, and seedling root length with increasing storage duration. Storage duration had little effect on the initial water absorption rate of seeds but influenced the progression of the imbibition stage. As storage time increased, the lag phase during the

收稿日期:2025-08-11;修回日期:2025-10-03

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32371760)资助

作者简介:李若鸿(2004-),女,汉族,湖南岳阳人,硕士研究生,主要从事草类种子生理与生产研究,E-mail:1206691536@qq.com;*通信作者 Author for correspondence, E-mail:maops@cau.edu.cn

imbibition of alfalfa seeds was prolonged. Natural ageing leads to a decline in the function of the AsA-GSH cycle during imbibition. Compared to seeds stored for 4 years, alfalfa seeds stored for 7 years exhibited significantly reduced activities of catalase (CAT), glutathione reductase (GR), and monodehydroascorbate reductase (MDHAR). Ascorbic acid (AsA) and glutathione (GSH) content decreased, and oxidised glutathione (GSSG) accumulated, indicating weakened reactive oxygen species (ROS) scavenging capacity and exacerbated membrane lipid peroxidation. Seeds stored for 4 years exhibited enhanced antioxidant capacity during the mid-to-late stages of imbibition by upregulating the activity of certain antioxidant enzymes, such as peroxidase (POD) and GR, thereby partially delaying the excessive accumulation of ROS. Using the membership function method, the germination capacity of alfalfa seeds was ranked as follows: 'Zhongmu No. 1' 4 a > 'Zhongmu No. 2'. 4 a > 'Zhongmu No. 1' 7 a > 'Zhongmu No. 2' 7 a. Compared to the 'Zhongmu No. 2' seeds, under natural ageing conditions, Zhongmu No. 1 exhibited relatively stable vigor and physiological status, demonstrating stronger storage tolerance.

Key words: Alfalfa seeds; Storage years; AsA-GSH cycle; Seed vigor

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)为豆科(Leguminosae)苜蓿属(*Medicago*)多年生草本植物^[1]。作为全球重要的牧草种质资源,该物种在我国人工牧草栽培体系中占据主导地位,其营养物质丰富,富含维生素、矿物质和膳食纤维等,是各类牲畜的优质饲草,享有“牧草之王”的美誉。种子作为植物繁殖的关键器官,其品质直接影响农业生产效益^[2]。种子在生理成熟期时,其生理潜力会达到峰值,此后的加工、贮存及运输等过程会引发种子老化,导致种子活力下降^[3]。种子老化是一个不可逆且具有累积效应的过程,会显著延迟种子出苗,抑制种子萌发进程,并降低幼苗的抗逆境能力^[4]。因此,深入解析紫花苜蓿种子在老化及吸胀期间抗氧化生理的调控机理,对保障种子质量和促进苜蓿产业发展具有重要指导价值。

现有大量研究证实,种子活力随贮藏时间延长而降低。例如,燕麦(*Avena sativa*)种子在自然老化过程中,其发芽势和发芽率呈现持续降低的趋势^[5]。水稻(*Oryza sativa*)种子活力随老化时间延长而显著减弱^[6]。随着老化进程,种子内部发生了一系列的生理生化变化,主要表现为细胞形态学变化、超微结构改变、呼吸频率降低及关键酶活性降低等方面,这些现象在大麦(*Hordeum vulgare*)种子^[7]和小麦(*Triticum aestivum*)种子^[8]的研究中得到证实。目前被广泛认同的自由基学说认为,植物有氧代谢产生具有强氧化性的ROS,当ROS过量积累时,ROS会氧化损伤核酸、蛋白、脂质等生物大分子,诱发细胞衰老^[9]。种子中抗氧化系统的主要功能为清除种子内过量的ROS以降低氧化损伤,抗氧化系统中主要包括抗坏血酸—谷胱甘肽循环(Ascorbate-glutathione cycle, AsA-GSH cycle)中超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、POD、CAT、GR和MDHAR等抗氧化酶类,以及AsA、氧化型抗坏血酸(Dehydroascorbic acid, DHA)、GSH和GSSG

等抗氧化物类^[4]。贮藏过程中,种子活力衰退常伴随着抗氧化防御能力的减弱。王勇等^[10]研究表明,自然贮藏的老芒麦(*Elymus sibiricus*)种子活力下降较快,种子浸出液电导率随贮藏年限增加而升高,POD和脱氢酶活性降低;张玲等^[11]对不同小麦品种种子的研究发现,随着自然老化时间的增加,小麦种子的SOD、POD和CAT活性均表现出不同程度的下降趋势。姚瑞瑞等^[12]研究发现,随着老化时间增加,燕麦种子中POD活性逐渐下降,ROS在种子内积累加剧了膜脂过氧化,破坏了抗氧化酶系统,造成细胞损伤;刘富华等^[13]研究发现,皂荚(*Gleditsia sinensis*)种子的CAT、POD和SOD活性随自然老化时间的延长而逐渐降低。种子贮藏期动态调控失衡,主要表现为关键酶代谢活性显著衰减,该现象会抑制呼吸代谢,阻碍ATP生物合成,能量供应不足直接导致萌发潜力衰退,这种生理衰退与抗氧化防御系统功能弱化显著相关^[14]。

前人常利用人工干预高温高湿条件加速种子老化以缩短试验周期,该方法虽简便可控,但因模拟条件与自然贮藏存在差异,其研究结论对实际储藏的指导价值可能受限。目前,针对自然老化下不同品种的紫花苜蓿种子发芽特性及抗氧化生理的研究尚不充分;关于老化种子抗氧化生理的研究多集中于萌发后的幼苗阶段,而对种子吸胀这一关键启动过程的研究较少。吸胀作用是种子从休眠转向活跃生长的重要阶段,此过程中种子快速吸水、呼吸作用恢复、线粒体等细胞器重建,抗氧化系统能否及时、有效地清除过量ROS,直接决定了种子能否顺利萌发并正常生长。因此,研究吸胀阶段抗氧化系统的动态响应,对于揭示种子老化的生理损伤机制至关重要。本研究为了系统阐述从干燥种子到生命活动完全启动的连续动态过程,将从吸水开始到胚根突破种皮的整个时段,界定为萌发早期的

吸胀过程。本试验选择紫花苜蓿品种‘中苜1号’和‘中苜2号’作为试验材料,研究不同自然老化程度的种子在吸胀萌发过程中抗氧化生理变化规律,揭示贮藏年限对种子吸胀过程中ROS代谢的调控机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验选用‘中苜1号’和‘中苜2号’紫花苜蓿种子(分别标记为ZM1和ZM2),其中‘中苜1号’种子材料在2017和2020年收获于甘肃省酒泉市大业种业公司上坝基地(98°46'E, 39°37'N,海拔1414 m),‘中苜2号’种子材料在2017和2020年收获于中国农业科学院北京畜牧兽医研究所赛乌素紫花苜蓿种子生产基地(106°95'E, 39°12'N,海拔1150 m),初始发芽率均在90%以上,收获种子风干后贮藏于中国农业大学牧草种子实验室种子贮藏室(分别贮藏7 a和4 a),室内干燥通风,无光照,年平均气温10~15℃。本试验于2024年11月至2025年3月在中国农业大学牧草种子实验室进行。

1.2 发芽试验

参照国际种子检验协会(International seed testing association, ISTA)种子检验规程(2024)^[15]规定的发芽条件,每个处理随机选取健康且大小、颜色相对均匀的紫花苜蓿种子100粒,裁取11.0 cm×11.0 cm滤纸,将三层滤纸垫在11.5 cm×11.5 cm的培养皿中,每个培养皿中添加10 mL蒸馏水,将紫花苜蓿种子整齐置于皿中,将培养皿放置于光照培养箱中,设置培养条件:温度为20℃,光照循环为16 h黑暗、8 h光照,设置4次重复。每24 h统计种子萌发情况,以胚根突破种皮2 mm为标准,计算种子发芽指数(GI)和平均发芽时间(MGT);第4 d初次计数,第10 d末次计数,统计正常种苗数,计算发芽势(GE)和发芽率(GP)。末次计数时,随机在每个培养皿中选取10株正常生长幼苗,使用直尺测量其苗长(SL)和根长(RL),计算活力指数(VI)。计算公式如下:

发芽势(%)=初次计数的正常种苗数/供试种子数;

发芽率(%)=终期全部正常种苗数/供试种子数;

平均发芽时间= $\sum(nt)/\sum n$;其中t是萌发天数,n为在第t天时萌发的种子数, $\sum n$ 是总萌发数;

发芽指数= $\sum(Gt/Dt)$;其中Gt为第t天的萌发数,Dt为萌发天数;

活力指数=(平均根长+平均苗长)×发芽指数^[16]。

1.3 种子吸胀曲线制作

用电子天平准确称重紫花苜蓿种子后,将种子均匀置于11.5 cm×11.5 cm的培养皿中,每个培养皿中铺有三层11.0 cm×11.0 cm滤纸,并添加10 mL蒸馏水,将培养皿放置于20℃培养箱中,在吸胀4,8,12,16,20,24,28,32,36 h后取出所有种子,立刻吸干种子表面水分,再次用电子天平准确称重,计算种子吸水率和吸水速率^[17]。每个时间点设置三个重复。计算公式如下:

种子吸水率(%)= $[(\text{吸水后种子重量}-\text{干种子重量})/\text{干种子重量}]\times 100\%$;

种子吸水速率=种子吸水后的重量变化量/吸水时间。

1.4 种子抗氧化酶活性测定

不同处理的种子分别吸胀8,16,20,24和32 h后液氮速冻,研磨后称取0.1 g粉末装于2 mL离心管中,加入1.6 mL预冷的50 mmol·L⁻¹ pH=7.0的磷酸缓冲液(含0.1 mmol·L⁻¹ EDTA和1% PVP),震荡混匀至匀浆。所得匀浆在4℃、12 000 g下离心20 min,上清液即为粗酶提取液用于抗氧化酶活性测定,参照李长然等^[18]的方法测定种子CAT, POD, SOD, MDHAR和GR活性。

1.5 种子抗氧化物含量测定

不同处理的种子分别吸胀后液氮速冻,研磨后称取0.1 g粉末。购买北京索莱宝科技有限公司的抗氧化剂试剂盒(BC1170、BC1180、BC1230和BC1240),根据其说明书测定种子GSH, GSSG, AsA和DHA含量。

1.6 数据统计分析和图表制作

利用WPS Office和SPSS 23.0软件进行数据整理和显著性统计分析(P值为0.05)。除发芽试验为4个重复以外,所有试验均为3个重复,用单因素方差分析(ANOVA)和邓肯检验(Duncan test)比较不同处理的平均值。用Graphpad Prism 10.5.0软件进行作图。

采用模糊数学隶属函数法^[19]对不同贮藏时间的紫花苜蓿种子发芽能力进行综合评价,计算各指标的隶属函数值,并按其平均值进行排名。

如果某个指标对种子发芽能力是高优指标, 计算公式如下:

$$U(X_i) = \frac{X - X_{\min}}{X_{\max} - X_{\min}};$$

如果某个指标对种子发芽能力是低优指标, 则用反隶属函数进行计算, 计算公式如下:

$$U(X_i) = 1 - \frac{X - X_{\min}}{X_{\max} - X_{\min}}。$$

式中: $U(X_i)$ 为隶属函数值, X_i 为某个指标的测定值, $X_{\max}$ 和 $X_{\min}$ 为所有处理中某个指标的最大值和最小值。

2 结果与分析

2.1 贮藏年份对紫花苜蓿种子发芽特性的影响

试验结果显示(图 1), 随着贮藏时间的延长, 紫

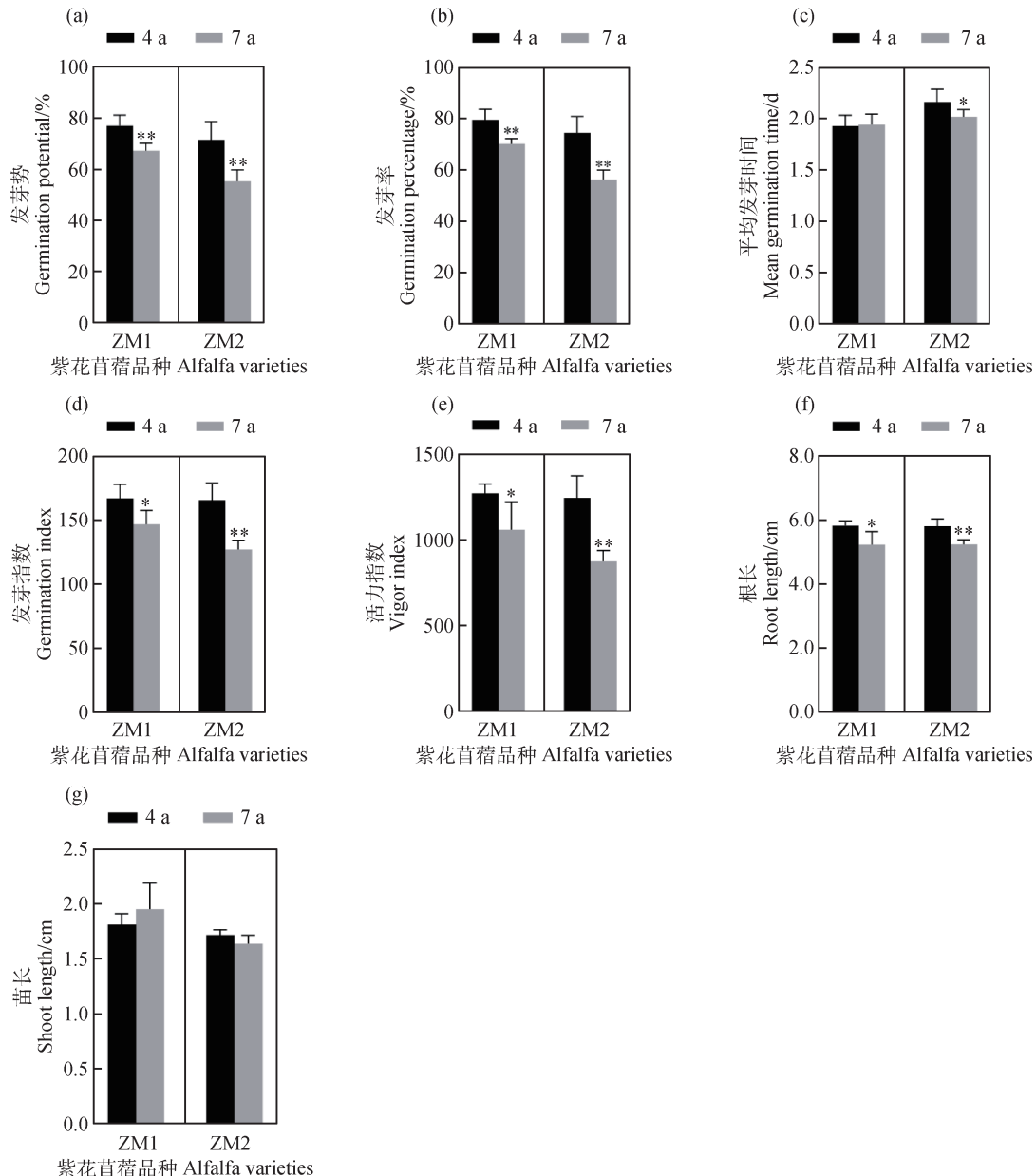


图 1 贮藏不同年份紫花苜蓿品种的种子发芽特性

Fig. 1 Seed germination characteristics of alfalfa varieties stored for different years

注: (a) 发芽势; (b) 发芽率; (c) 平均发芽时间; (d) 发芽指数; (e) 活力指数; (f) 根长; (g) 苗长。所示误差棒均为四个重复的标准误(SE)。*表示在 0.05 水平下差异显著, **表示在 0.01 水平下差异显著

Note: (a) Germination potential; (b) Germination percentage; (c) Mean germination time; (d) Germination index; (e) Vigor index; (f) Root length; (g) Shoot length. Data are presented as mean $\pm$ standard error (SE), where SE was determined from four replicates. * indicate significant differences at the 0.05 level, ** indicate significant differences at the 0.01 level

花苜蓿种子的发芽势、发芽率、发芽指数、活力指数和根长均出现了不同程度的下降。贮藏 4 a 的 ZM1 种子的发芽势最高,为 77%,ZM2 的发芽势下降幅度更大,贮藏 7 a 后发芽势从贮藏 4 a 的 72% 降至 55% (图 1a)。紫花苜蓿种子的发芽率变化规律与发芽势一致,ZM1 贮藏 7 a 后发芽率从贮藏 4 a 的 80% 降至 70%,ZM2 从 75% 降至 56%,ZM2 变化幅度更大(图 1b)。贮藏 4 a 与贮藏 7 a 后 ZM1 种子的平均发芽时间无显著变化,但 ZM1 贮藏 4 a 后的平均发芽时间显著高于贮藏 7 a (图 1c) ($P<0.05$)。ZM2 的发芽指数、活力指数和根长下降幅度较为明显,贮藏 7 a 后的发芽指数、活力指数和根长分别为 127.15, 875.46 和 5.24 cm,均显著低于贮藏 4 a 的同品种种子 ($P<0.05$);虽然 ZM1 和 ZM2 贮藏 4 a 种子的发芽指数、活力指数和根长差别不大,但 ZM2 随贮藏时间延长,

各指标下降幅度较大(图 1d、1e 和 1f)。贮藏时间对紫花苜蓿幼苗苗长影响不显著(图 1g)。

2.2 贮藏年份对紫花苜蓿种子吸水特性的影响

将紫花苜蓿种子在 20℃ 适宜条件下进行吸胀处理,根据吸胀曲线(图 2a 和 2b)总结各贮藏年份吸水阶段(表 1),自然老化对紫花苜蓿种子吸水率的影响主要体现在种子吸水时的再次大量吸水期。对比不同品种紫花苜蓿种子的吸水速率(图 2c 和 2d),发现在吸胀初期不同品种之间的吸水速率存在明显差别,但贮藏时间对种子吸水速率影响不大;相较于贮藏 4 a 的种子,贮藏更长时间延长了种子的吸水滞缓期。根据试验结果,选取涵盖快速吸水期、吸水滞缓期和再次大量吸水期的关键时间点(8, 16, 20, 24 和 32 h)进行取样。

表 1 贮藏不同年份紫花苜蓿种子的吸胀阶段

Table 1 The imbibition stages of alfalfa seeds stored for different years

处理 Treatments	快速吸水期 Rapid water absorption phase	吸水滞缓期 Lag phase	再次大量吸水期 Second phase of substantial water absorption
ZM1 4 a	0~16 h	16~20 h	20 h~
ZM1 7 a	0~16 h	12~24 h	24 h~
ZM2 4 a	0~8 h	8~20 h	20 h~
ZM2 7 a	0~8 h	8~24 h	24 h~

2.3 贮藏年份对吸胀期间紫花苜蓿种子抗氧化酶活性的影响

不同处理的紫花苜蓿种子各抗氧化酶活性在吸胀期间呈现不同的变化规律。CAT 活性测定结果显示,随着吸胀时间的延长,贮藏 7 a 的紫花苜蓿种子 CAT 活性整体呈现逐渐降低的趋势,贮藏 4 a 的 ZM2 种子优于 ZM1;ZM1 中,除吸胀 8 h 时贮藏 4 a 的种子 CAT 活性显著低于贮藏 7 a 外 ($P<0.05$),其余吸胀时期贮藏 4 a 的种子均显著高于 7 a ($P<0.05$);ZM2 中,贮藏 4 a 的种子 CAT 活性在各吸水阶段均显著高于 7 a ($P<0.05$)。ZM1 在吸水滞缓期 CAT 活性显著升高,而 ZM2 在该阶段呈下降趋势(图 3a) ($P<0.05$)。

在紫花苜蓿种子 POD 活性测定中,不同品种的种子呈现出不同的变化规律。ZM1 中,除吸胀 32 h 时贮藏 7 a 与 4 a 的种子 POD 活性无显著差异,其余吸胀阶段贮藏 7 a 均显著高于 4 a ($P<0.05$);贮藏 4 a 的 ZM2 种子在吸胀前期 POD 活性较低,随着吸胀的进行该指标显著高于贮藏 7 a 的种子 ($P<0.05$)。随着吸胀时间的延长,各处理紫花苜蓿种子 POD 活性呈现先上升后下降的变化趋势,在吸胀 16 h 时达到峰值(图 3b)。

不同处理的紫花苜蓿种子在吸胀过程中 SOD 活性基本呈现先上升后下降再上升的趋势。吸胀 8 h 时,

贮藏 7 a 与 4 a 的 ZM1 种子的 SOD 活性无显著差异,其中贮藏 7 a 后的种子吸胀 20 h 时 SOD 活性达到最大值,并在该时期和吸胀 24 h 时显著高于贮藏 4 a 后的种子 ($P<0.05$),随着吸胀的进行,贮藏 7 a 的种子 SOD 活性逐渐下降,在吸胀 32 h 时显著低于 4 a ($P<0.05$);ZM2 中,吸胀 8 h 和 16 h 时,贮藏 7 a 的种子 SOD 活性显著低于 4 a ($P<0.05$),随着吸胀的进行,贮藏 7 a 的种子显著高于贮藏 4 a 的种子(图 3c) ($P<0.05$)。

ZM1 的不同贮藏年限种子 MDHAR 活性在吸胀期间呈现出不同的趋势;贮藏 7 a 后的种子呈逐渐下降的趋势,4 a 的则呈上升趋势,且除吸胀 8 h 两者无显著差异外,其余吸胀期间贮藏 7 a 的种子 MDHAR 活性显著低于 4 a ($P<0.05$)。ZM2 不同贮藏年限种子 MDHAR 活性在吸胀期间的变化趋势相对一致;除吸胀 8 h 外,贮藏 4 a 的种子 MDHAR 活性均显著高于贮藏 7 a 的种子(图 3d) ($P<0.05$)。

ZM1 中,除吸胀 8 h 外,贮藏 7 a 的种子 GR 活性均显著低于 4 a ($P<0.05$);随着吸胀的进行,两者均在迟滞阶段时 GR 活性显著降低 ($P<0.05$)。ZM2 不同贮藏年限种子在吸胀过程中 GR 活性呈现相对一致的变化;除吸胀 16 和 20 h 外,贮藏 7 a 的种子 GR 活性均显著低于 4 a (图 3e) ($P<0.05$)。

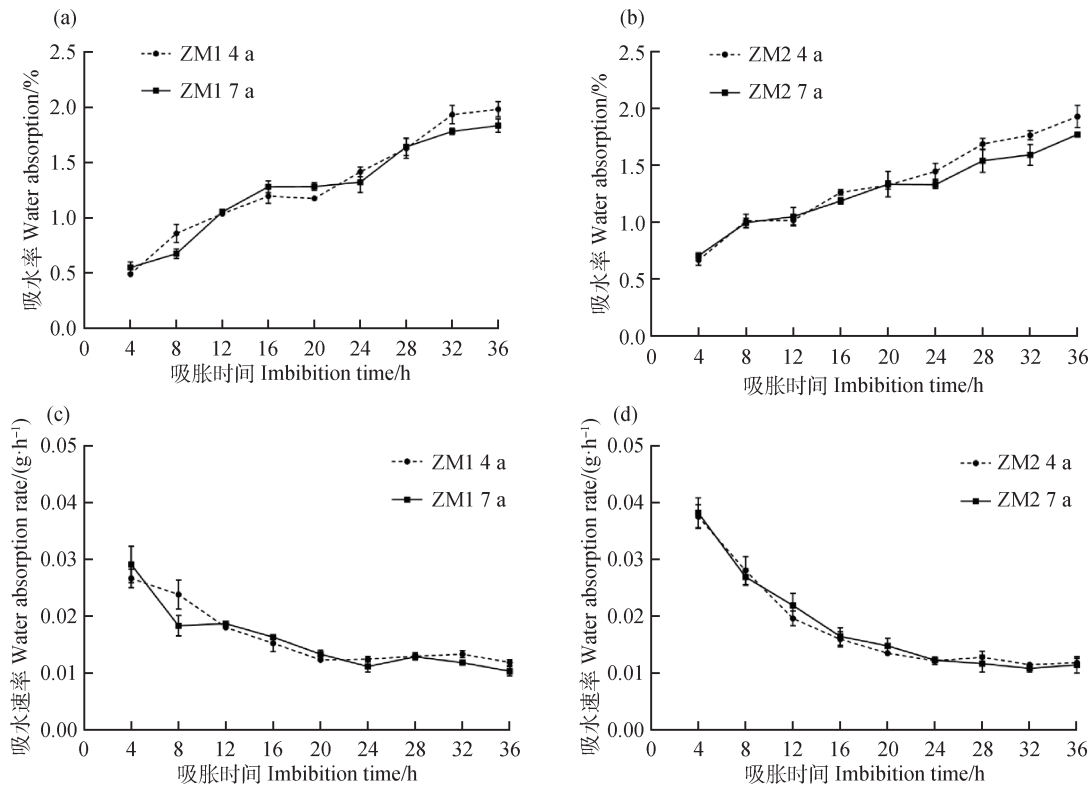


图2 贮藏不同年份紫花苜蓿种子吸水特性变化

Fig. 2 Changes of water absorption characteristics of alfalfa seeds stored different years

注: (a) ZM1 吸水率; (b) ZM2 吸水率; (c) ZM1 吸水速率; (d) ZM2 吸水速率。所示误差棒均为三个重复的标准误 (SE), 下同

Note: (a) ZM1 water absorption; (b) ZM2 water absorption; (c) ZM1 water absorption rate; (d) ZM2 water absorption rate. Data are presented as mean $\pm$ standard error (SE), where SE was determined from three replicates, the same as below

2.4 贮藏年份对吸胀期间紫花苜蓿种子抗氧化物含量的影响

ZM1 和 ZM2 不同贮藏时间紫花苜蓿种子在吸水 20 h 时 GSH 含量均无显著差异。ZM1 中, 吸水迟滞阶段贮藏 7 a 后的种子 GSH 含量相对稳定, 而贮藏 4 a 的种子在吸胀 16 h 时达到峰值; 除吸胀 20 h 时, 其余吸胀阶段贮藏 7 a 的种子 GSH 含量均显著低于 4 a ($P < 0.05$)。ZM2 中, 不同贮藏时间种子在吸胀期间其 GSH 含量呈现不同的变化规律; 贮藏 7 a 后的种子在吸胀前中期 GSH 含量相对稳定, 在吸胀 24 h 时显著下降 ($P < 0.05$), 但在吸胀 32 h 时显著上升; 随着吸胀的进行, 贮藏 4 a 后的种子的 GSH 含量呈现先下降后上升再下降的趋势, 并在吸胀 32 h 时显著低于贮藏 7 a 的种子 GSH 含量 (图 4a) ($P < 0.05$)。

随着吸胀时间的增加, 两品种的紫花苜蓿种子 GSSG 含量呈先上升后下降的趋势。ZM1 中, 除吸胀 8 h 时贮藏 7 a 后的种子 GSSG 含量显著低于贮藏 4 a 及吸胀 20 h 时两者无显著差异外, 其余吸胀阶段贮藏 7 a 的种子 GSSG 含量均显著高于 4 a ($P < 0.05$)。

ZM2 中, 吸胀 8、16 和 20 h 时, 贮藏 7 a 后的种子 GSSG 含量均显著低于贮藏 4 a ($P < 0.05$), 吸胀 24 h 时, 贮藏 4 a 的种子进入发芽阶段, 其 GSSG 含量显著低于贮藏 7 a 的种子 ($P < 0.05$); 吸胀 32 h 时, 两者均进入发芽阶段, 其 GSSG 含量无显著差异 (图 4b)。

在紫花苜蓿种子 AsA 含量测定中发现, 随着吸胀时间的增加, 贮藏时间较长的种子 AsA 含量逐渐下降, 而贮藏时间较短的种子 AsA 含量在吸胀过程中出现了短时期上升的情况。ZM1 中, 吸胀 16 h 时贮藏 4 a 的种子的 AsA 含量显著上升, 且显著高于贮藏 7 a 的种子 ($P < 0.05$); 吸胀 32 h 时, 两者无显著差异。ZM2 中, 吸胀 24 h 时贮藏 4 a 的种子 AsA 含量显著上升, 且显著高于贮藏 7 a 的种子 (图 4c) ($P < 0.05$)。

紫花苜蓿种子 DHA 含量测定结果显示, 随着吸胀时间的增加, 不同处理的种子 DHA 含量基本呈现逐渐上升的趋势。ZM1 中, 贮藏 4 a 的种子 DHA 含量在各吸胀阶段均显著高于贮藏 7 a 的种子 ($P < 0.05$)。ZM2 中, 贮藏 4 a 的种子 DHA 含量在各吸胀阶段均显著高于贮藏 7 a 的种子 (图 4d) ($P < 0.05$)。

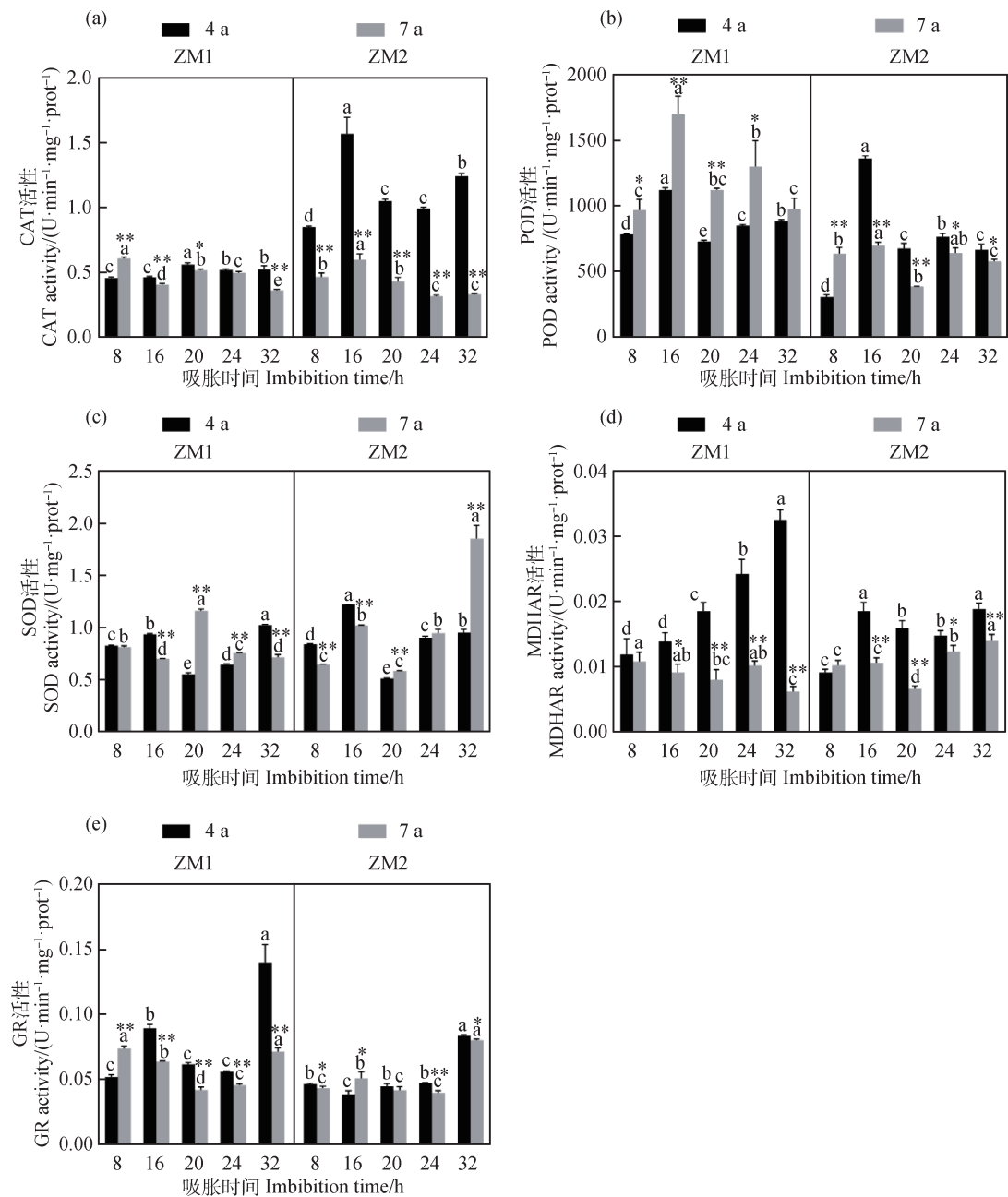


图 3 贮藏不同年份紫花苜蓿种子吸胀过程中抗氧化酶活性的变化

Fig. 3 Changes in antioxidant enzyme activities during imbibition of alfalfa seeds stored different years

注:(a)CAT 活性;(b)POD 活性;(c)SOD 活性;(d)MDHAR 活性;(e)GR 活性。图注中不同小写字母表示相同贮藏时间同一品种种子处理间 0.05 水平上差异显著,*表示相同品种同一吸胀时间下不同贮藏时间在 0.05 水平下差异显著,**表示在 0.01 水平下差异显著,下同

Note: (a)CAT activity; (b)POD activity; (c)SOD activity; (d)MDHAR activity; (e)GR activity. Different lowercase letters in the figure caption indicate significant differences at the 0.05 level among seed treatments of the same variety with the same storage time. * indicates significant differences at the 0.05 level among different storage times of the same variety under the same imbibition time, and ** indicates significant differences at the 0.01 level, the same applies below

2.5 不同贮藏年限下紫花苜蓿种子发芽特性与抗氧化系统的综合评价及响应规律

采用隶属函数法,以发芽率、发芽势、发芽指数和活力指数等 16 个指标作为评价指标(表 2),对贮藏不同时间的不同品种的紫花苜蓿种子发芽能力进行

综合评价,其中平均发芽时间为低优指标,其他指标为高优指标。贮藏 4 a 和 7 a 的紫花苜蓿种子的平均隶属函数值在 0.17~0.71 之间。根据平均隶属函数值进行排序,得出紫花苜蓿种子发芽能力大小随贮藏时间的延长而递减,且 ZM1 种子活力更高。

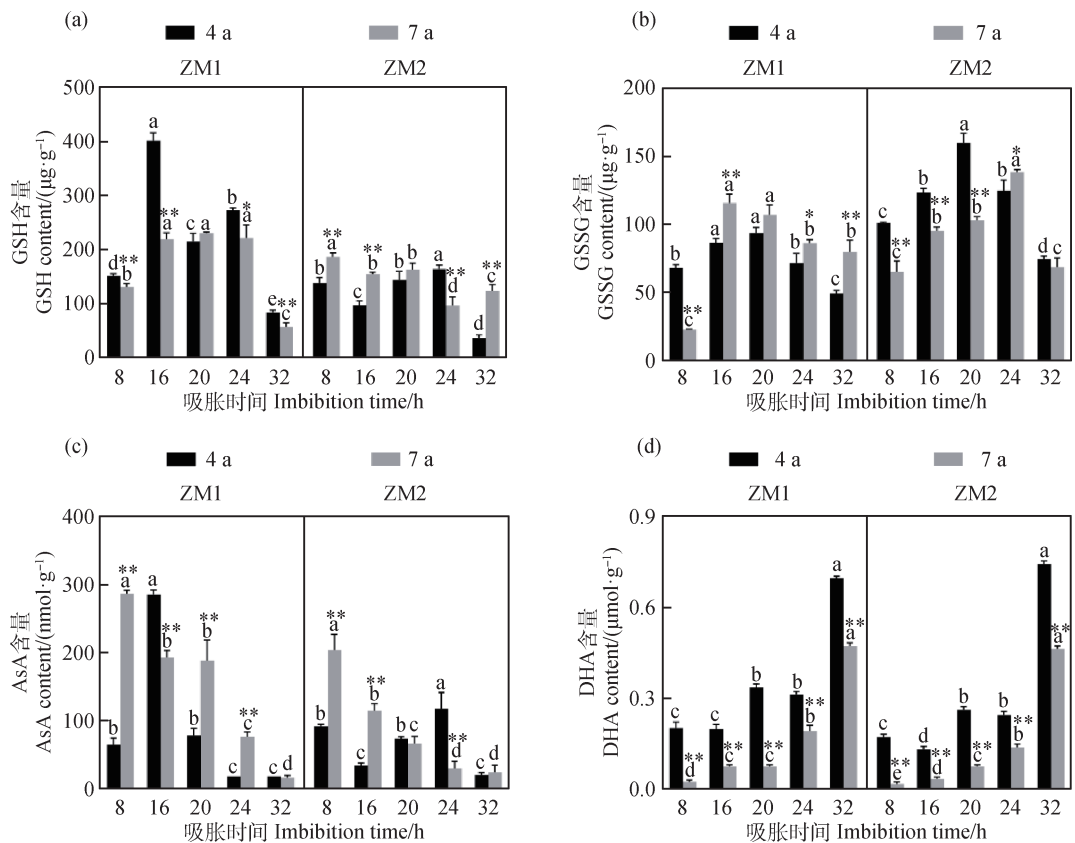


图 4 贮藏不同年份紫花苜蓿种子吸胀过程中抗氧化物含量的变化

Fig. 4 Changes in antioxidant content during the imbibition of alfalfa seeds stored different years

注: (a)GSH 含量; (b)GSSG 含量; (c)AsA 含量; (d)DHA 含量

Note: (a)GSH content; (b)GSSG content; (c)AsA content; (d)DHA content

表 2 不同贮藏年限下紫花苜蓿种子各指标隶属函数值及综合评价

Table 2 Membership function values of various indicators and comprehensive evaluation of alfalfa seeds stored different years

指标 Index	ZM1		ZM2	
	4 a	7 a	4 a	7 a
发芽势 GE	1.00	0.55	0.75	0.00
发芽率 GP	1.00	0.60	0.78	0.00
平均发芽时间 MGT	1.00	0.95	0.00	0.61
发芽指数 GI	1.00	0.49	0.96	0.00
根长 RL	1.00	0.00	0.98	0.02
苗长 SL	0.54	1.00	0.25	0.00
活力指数 VI	1.00	0.46	0.93	0.00
CAT 活性	0.10	0.07	1.00	0.00
POD 活性	0.46	1.00	0.27	0.00
SOD 活性	0.00	0.16	0.42	1.00
MDHAR 活性	1.00	0.00	0.58	0.17
GR 活性	1.00	0.28	0.03	0.00
GSH 含量	1.00	0.51	0.00	0.27
GSSG 含量	0.00	0.20	1.00	0.47
AsA 含量	0.30	1.00	0.00	0.24
DHA 含量	1.00	0.11	0.81	0.00
平均值	0.71	0.46	0.55	0.17
排序	1	3	2	4

基于本试验中不同处理对紫花苜蓿种子吸胀过程中抗氧化酶活性和抗氧化物含量的影响,绘制了紫花苜蓿种子吸胀过程中抗氧化系统对贮藏年限及吸胀时间的响应规律示意图(图5)。与贮藏7 a的种子相比,贮藏4 a的紫花苜蓿种子在吸胀过程中能通过调控AsA-GSH循环各组分及时清除ROS,ROS含量逐渐降低,缓解了长时间贮藏对种子萌发的限制作用。在吸胀过程中,由于无法及时调动抗氧化酶和抗氧化物清除过量ROS,贮藏7 a的种子受到更严重的氧化损伤,部分种子死亡,发芽率降低。

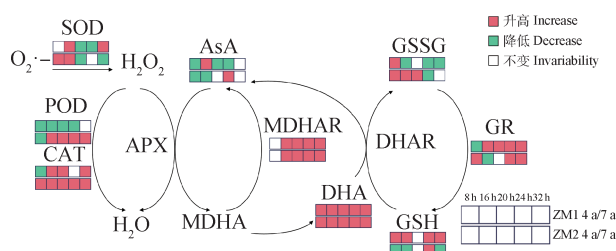


图5 紫花苜蓿种子抗氧化系统对贮藏时间的响应示意图

Fig. 5 Schematic diagram of the response of alfalfa seed anti-oxidant system to storage time

注:红色代表显著上升,绿色代表显著下降,白色代表无显著差异。
 □从上到下分别表示 ZM1 4 a/7 a 和 ZM2 4 a/7 a, 从左到右依次为
 吸胀 8, 16, 20, 24 和 32 h。APX、MDHA 和 DHAR 分别表示抗坏血
 酸过氧化物酶、单脱氢抗坏血酸和脱氢抗坏血酸还原酶

Note: Red represents significant increase, green represents significant decrease, white represents insignificant difference. Square represents from top to bottom: ZM1 4 a/7 a and ZM2 4 a/7 a, from left to right: imbibition 8, 16, 20, 24 and 36 h. APX, MDHA and DHAR represent ascorbic acid peroxidase, monodehydroascorbic acid and dehydroascorbic acid reductase respectively

3 讨论

3.1 紫花苜蓿自然老化种子的发芽特性

种子萌发通常是植物生长的关键,发芽势、发芽率、平均发芽时间等是衡量种子发芽能力的重要指标^[20]。本试验发现,随着贮藏时间的增加,紫花苜蓿种子的发芽势、发芽率、发芽指数、活力指数和根长随之降低,这与小麦^[11]种子和老芒麦^[21]种子在老化过程中种子发芽能力变化的结果相似,说明长时间贮藏会导致紫花苜蓿种子活力下降;辛慧慧等^[22]发现贮藏时间过长会导致紫羊茅(*Festuca rubra*)和苇状羊茅(*F. arundinacea*)种子胚根长度和苗长降低,进一步证明了贮藏年限长会限制幼苗长势。

种子吸水速率的快慢在一定程度上反映了种子活力的高低,是影响种子萌发快慢的一个因素。

本研究发现,自然老化对紫花苜蓿种子吸水率的影响主要体现在种子吸胀过程中的再次大量吸水期,随着贮藏时间的延长,再次大量吸水期时种子的吸水率逐渐下降,并延长种子吸水滞缓期的时间,但贮藏时间对快速吸水期和吸水滞缓期的吸水率影响不明显;在快速吸水期,‘中苜2号’种子表现出比‘中苜1号’更强的吸水速率,但贮藏时间对种子的吸水速率影响不明显。

3.2 紫花苜蓿自然老化种子抗氧化系统在吸胀过程中的变化

在种子萌发过程中,抗氧化系统主要通过酶与非酶组分协同维持ROS含量平衡,对维持种子氧化损伤防御功能有重要作用。AsA-GSH循环在清除ROS,尤其是清除 H_2O_2 方面具有重要作用^[23]。GR、MDHAR、AsA和GSH是植物AsA-GSH循环的重要组成部分;GR催化NADPH将GSSG还原生成GSH;MDHAR能够催化NADH将单脱氢抗坏血酸(Monodehydroascorbic acid, MDHA)生成AsA;AsA可还原 O^{2-} ,清除 H_2O_2 等ROS;GSH具有巯基而易被氧化^[24]。在本试验中,贮藏时间较长的紫花苜蓿种子吸胀过程中的MDHAR活性始终处于较低水平,长时间贮藏的ZM1种子的GR活性、AsA和GSH含量在吸胀时期内处于较低水平,且随着吸胀的进行呈下降趋势,其中GR和MDHAR活性变化与米春娇等^[16]的研究结果相似,GSH含量变化与廖乐^[25]的研究结果相似。值得关注的是,贮藏7 a的ZM2种子在吸胀前期(8和16 h)的GR活性和GSH含量显著增加。推测原因是长时间贮藏影响了紫花苜蓿种子的AsA-GSH循环,但随着吸胀的进行,种子通过某些信号途径使GR活性维持较高水平,而GR是维持GSH含量的关键酶^[26],进而促进了GSH含量的增加,一定程度上缓解了ROS引起的氧化损伤。

CAT和POD可以将 H_2O_2 反应生成 H_2O 和 O_2 ,是植物抗氧化系统中十分重要的酶^[27]。本试验发现,贮藏时间较长的紫花苜蓿种子吸胀过程中CAT活性处于较低水平,影响了 H_2O_2 的清除。贮藏4 a的ZM2种子在吸胀中期(16, 20和24 h)的POD活性显著高于贮藏7 a的同品种种子;与ZM2不同的是,贮藏7 a的ZM1种子吸胀过程中POD活性始终低于贮藏4 a的同品种种子,这在一定程度上缓解了由于其CAT活性不足,致使 H_2O_2 积累对细胞造成的氧化损伤。这说明经过长时间贮藏的ZM1种子

在适宜条件下吸胀一段时间后,种子通过提高部分抗氧化酶的活性以清除过量 ROS,逐渐恢复了抗氧化能力,这与老化大麦^[28]种子的萌发相似。

H₂O₂虽然毒性较低,但 H₂O₂会在 O^{2·-}存在时生成强毒性的·OH^[29];SOD 可以催化 O^{2·-}发生歧化反应,生成 H₂O₂和 O₂^[30]。本试验发现,贮藏 4 a 的紫花苜蓿种子 SOD 活性在吸胀中期较低;与之对比,贮藏 7 a 的种子 SOD 活性在各吸胀时期并未表现出明显的变化规律。在本试验中,随着吸胀时间的增加,紫花苜蓿种子 DHA 含量呈现上升趋势,且贮藏 4 a 的种子始终处于较高水平,GSSG 含量在多数吸胀时期内处于较高水平。DHA 和 GSSG 分别是生成 AsA 和 GSH 的反应底物;因此,较短贮藏时间对紫花苜蓿种子抗氧化系统破坏较小。

3.3 不同紫花苜蓿品种种子存在耐贮性差异

与贮藏相同年限的种子相比,ZM1 具有更高的发芽势和发芽率(图 1a 和 1b),且其贮藏 7 a 后的发芽指数、活力指数和根长的降幅小于 ZM2(图 1d、1e 和 1f)。ZM1 在自然贮藏后能维持更高的抗氧化系统稳定性,其关键酶 MDHAR 和 GR 活性及 GSH 含量(图 3d 和 3e、图 4a)优于 ZM2,尤其 GR 作为维持 GSH/GSSG 平衡的核心酶^[31],在 ZM1 种子吸胀中后期仍保持较高活性,有效缓解了 ROS 积累导致的氧化损伤;而 ZM2 贮藏 7 a 后则出现 CAT、GR 活性和 AsA 含量降低及 GSSG 含量积累(图 3 a 和 3 e、图 4b 和 4c),导致种子内 ROS 积累,产生氧化损伤,影响种子的萌发进程。本研究通过隶属函数法综合评价(表 2)表明,在自然老化条件下,ZM1 与 ZM2 种子的耐贮性存在显著差异。根据平均隶属函数值,紫花苜蓿种子发芽能力排序为 ZM1 4 a>ZM2 4 a>ZM1 7 a>ZM2 7 a,ZM1 种子在贮藏 4 a 与 7 a 后的平均隶属函数值均分别高于同贮藏时间的 ZM2 种子,表明 ZM1 具有更强的长期贮藏适应性。

4 结 论

贮藏 7 a 显著降低紫花苜蓿种子的发芽能力,具体表现为发芽势、发芽率、发芽指数、活力指数和幼苗根长随贮藏年限增加而下降。贮藏年限对种子初期吸水速率影响不大,但会影响吸胀阶段进程,随着贮藏时间的延长,吸胀过程中紫花苜蓿种子的吸水滞缓期延长。自然老化会导致种子吸胀期间

抗坏血酸—谷胱甘肽系统功能衰退,贮藏 7 a 的种子过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶和单脱氢抗坏血酸还原酶活性显著降低,抗坏血酸和谷胱甘肽含量减少,氧化型谷胱甘肽积累,活性氧清除能力减弱,膜脂过氧化加剧。贮藏 4 a 的种子在吸胀中后期通过上调过氧化物酶和谷胱甘肽还原酶活性,延缓活性氧积累,表现出更强的抗氧化能力。根据平均隶属函数值,紫花苜蓿种子发芽能力排序为‘中苜 1 号’4 a>‘中苜 2 号’4 a>‘中苜 1 号’7 a>‘中苜 2 号’7 a,相较于‘中苜 2 号’种子,在自然老化条件下‘中苜 1 号’表现出相对稳定的活力状态,显示出较强的耐贮性。

参考文献

- [1] 中国饲用植物志编辑委员会. 中国饲用植物志-第二卷[M]. 北京:农业出版社,1989:12-14
Editorial Committee of the Chinese Feed Plants Catalogue. Chinese feed plant catalogue-Volume 2[M]. Beijing: Agricultural Press,1989:12-14
- [2] DEMIR I, ELLIS R H. Changes in potential seed longevity and seedling growth during seed development and maturation in marrow[J]. Seed Science Research,1993,3(4):247-257
- [3] EBONE L A, CAVERZAN A, CHAVARRIA G. Physiologic alterations in orthodox seeds due to deterioration processes[J]. Plant Physiology and Biochemistry,2019,145:34-42
- [4] ZHANG K L, ZHANG Y, SUN J, et al. Deterioration of orthodox seeds during ageing: influencing factors, physiological alterations and the role of reactive oxygen species[J]. Plant Physiology and Biochemistry,2021(158):475-485
- [5] 姚瑞瑞. 不同老化方式下皮燕麦和裸燕麦种子生理及细胞学特征研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2024:13-14
YAO R R. Study on physiological and cytological characteristics of covered oat and naked oat seeds under different aging methods [D]. Lanzhou:Gansu Agricultural University,2024:13-14
- [6] BARIK S R, PANDIT E, SANGHAMITRA P, et al. Unraveling the genomic regions controlling the seed vigour index, root growth parameters and germination per cent in rice[J]. PLoS One,2022,17(7):e0267303
- [7] 王凤, 齐军仓, 郭亚南, 等. 人工老化处理对大麦种子萌发早期淀粉及淀粉酶活性的影响[J]. 中国粮油学报,2017,32(8):14-21
WANG F, QI J C, GUO Y N, et al. Effect of aging on starch and amylase activity of barley seeds in early germination[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association,2017,32(8):14-21
- [8] AHMED Z, YANG H, FU Y B. The associative changes in Scutellum nuclear content and morphology with viability loss of naturally aged and accelerated aging wheat (*Triticum aestivum*) seeds[J]. Frontiers in Plant Science,2016(7):1474
- [9] HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry [J]. Journal of Gerontology, 1956, 11 (3) : 298-300
- [10] 王勇, 徐春波, 韩磊. 不同贮藏年限老芒麦种子活力研究[J].

- 种子,2012,31(8):14-17
- WANG Y, XU C B, HAN L. Studies on seed vigor and physiological indicators of different storage duration *Elymus sibiricus* L [J]. Seed, 2012, 31(8): 14-17
- [11] 张玲, 曹磊, 蔡诚, 等. 自然老化条件下冬小麦种子活力及生理指标变化[J]. 中国农业科学, 2025, 58(5): 877-889
- ZHANG L, CAO L, CAI C, et al. Changes in seed vigor and physiological index of winter wheat under natural aging condition [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2025, 58(5): 877-889
- [12] 姚瑞瑞, 刘欢, 马圆, 等. 自然老化和人工老化对燕麦种子内源激素和抗氧化酶活性的影响[J]. 草原与草坪, 2025, 45(5): 175-182, 191
- YAO R R, LIU H, MA Y, et al. Effects of natural and artificial aging on endogenous hormone and antioxidant enzyme activities in oat seeds [J]. Grassland and Turf, 2025, 45(5): 175-182, 191
- [13] 刘富华, 王秀荣, 赵杨, 等. 不同自然老化时间的皂荚种子活力及生理差异研究[J]. 种子, 2023, 42(12): 45-51
- LIU F H, WANG X R, ZHAO Y, et al. Study on seed vigor and physiological differences of *Gleditsia sinensis* with different natural aging time [J]. Seed, 2023, 42(12): 45-51
- [14] 普布卓玛, 索朗旦增, 仁增旺姆, 等. 储藏过程中种子老化机制的研究进展[J]. 西藏农业科技, 2023, 45(1): 49-52
- PUBUZHUOMA, SUO L, REN Z, et al. Research progress on seed aging mechanism during storage [J]. Tibet Journal of Agricultural Sciences, 2023, 45(1): 49-52
- [15] International Seed Testing Association. International rules for seed testing [S]. Wallisellen: The International Seed Testing Association, 2024: 114
- [16] 米春娇, 洪流, 马馼, 等. 谷胱甘肽引发对老化燕麦种子发芽与幼苗生长特性的影响[J]. 草地学报, 2024, 32(3): 928-934
- MI C J, HONG L, MA W, et al. Effects of glutathione priming on germination and seedling growth characteristics of aged oat seeds [J]. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(3): 928-934
- [17] 孙守江, 唐艺涵, 马馼, 等. 紫花苜蓿种子吸胀期胚根线粒体AsA-GSH循环对低温胁迫的响应[J]. 草业学报, 2023, 32(3): 152-162
- SUN S J, TANG Y H, MA W, et al. Response of the mitochondrial AsA-GSH cycle during alfalfa seed germination under low temperature stress [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2023, 32(3): 152-162
- [18] 李长然, 刘婧禹, 李若鸿, 等. 生物炭结壳包衣对蒙古冰草萌发期抗旱特性的影响[J]. 草地学报, 2025, 33(3): 960-967
- LI C R, LIU J Y, LI R H, et al. Effects of biochar encrusting on drought resistance characteristics of *Agropyron mongolicum* during seed germination [J]. Acta Agrestia Sinica, 2025, 33(3): 960-967
- [19] 吕艳敏, 花梅, 张晓明, 等. 贮藏年限对白三叶种子萌发、幼苗生长及生理特性的影响[J]. 草地学报, 2023, 31(1): 287-293
- LYU Y M, HUA M, ZHANG X M, et al. Effects of storage years on seed germination, seedling growth and physiological characteristics of white clover [J]. Acta Agrestia Sinica, 2023, 31(1): 287-293
- [20] APEL K, HIRT H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction [J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55: 373-399
- [21] 孙守江, 马馼, 祁娟, 等. 老芒麦种子染色体端粒及抗氧化防御系统对自然老化的响应[J]. 草地学报, 2022, 30(10): 2549-2557
- SUN S J, MA W, QI J, et al. Response of chromosome telomere and antioxidant defense system to natural aging of *Elymus sibiricus* seeds [J]. Acta Agrestia Sinica, 2022, 30(10): 2549-2557
- [22] 辛慧慧, 张云玲, 孙强, 等. 不同贮藏年限对羊茅属两种牧草种子萌发活力的影响[J]. 草食家畜, 2022(4): 33-38
- XIN H H, ZHANG Y L, SUN Q, et al. Effect of different storage years on seed germination activity of two forage grass species of *Festuca* L [J]. Grass-Feeding Livestock, 2022(4): 33-38
- [23] VAN BREUSEGEM F, VRANOVÁ E, DAT J F, et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction [J]. Plant Science, 2001, 161(3): 405-414
- [24] 许英, 陈建华, 朱爱国, 等. 低温胁迫下植物响应机理的研究进展[J]. 中国麻业科学, 2015, 37(1): 40-49
- XU Y, CHEN J H, ZHU A G, et al. Research progress on response mechanism of plant under low temperature stress [J]. Plant Fiber Sciences in China, 2015, 37(1): 40-49
- [25] 廖乐. 人工老化对大麦种子生理生化特性和麦芽品质影响的研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2015: 23-24
- LIAO L. Effects of artificial aging on physiological and biochemical characteristics and malt quality of barley seeds [D]. Shihezi: Shihezi University, 2015: 23-24
- [26] KHAN N A, SINGH S, UMAR S. Sulfur assimilation and abiotic stress in plants [M]. Berlin: Heidelberg Springer, 2008: 111
- [27] 薛爽, 饶丽莎, 左丹丹, 等. 植物低温胁迫响应机理的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(33): 17-19, 48
- XUE S, RAO L S, ZUO D D, et al. Research progress on the response mechanism of plants to low temperature stress [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(33): 17-19, 48
- [28] 朱迎树. 引发对老化大麦种子生理生化变化影响的研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2019: 29-34
- ZHU Y S. Effects of priming on physiological and biochemical changes of aging barley seeds [D]. Shihezi: Shihezi University, 2019: 29-34
- [29] 瓜谷郁三. 植物逆境生物化学及分子生物学 [M]. 谢国生, 李合生译. 北京: 中国农业出版社, 2004: 116
- UTSO KUWATANI. Biochemistry and molecular biology of plant stress [M]. XIE G S, LI H S translated. Beijing: China Agriculture Press, 2004: 116
- [30] 尹永强, 胡建斌, 邓明军. 植物叶片抗氧化系统及其对逆境胁迫的响应研究进展[J]. 中国农学通报, 2007(1): 105-110
- YIN Y Q, HU J B, DENG M J. Latest development of antioxidant system and responses to stress in plant leaves [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007(1): 105-110
- [31] JOBBAGY S, VITTURI D A, SALVATORE S R, et al. Electrophiles modulate glutathione reductase activity via alkylation and upregulation of glutathione biosynthesis [J]. Redox Biology, 2019, 21: 101050