

AP2 转录因子 OsERF34 正向调控水稻种子休眠

杜志敏^{1,2,#} 贾一楠^{1,#} 段影青² 曹妮² 马刘洋² 董欣丽² 徐海¹ 焦桂爱²
唐绍清^{2,*} 胡培松^{2,*}

(¹沈阳农业大学, 沈阳 110011; ²中国水稻研究所, 杭州 311401; [#]共同第一作者; ^{*}通信联系人, email: tangshaoqing@caas.cn; peisonghu@126.com)

AP2 Transcription Factor OsERF34 Positively Regulates Seed Dormancy in Rice

DU Zhimin^{1,2,#}, JIA Yanan^{1,#}, DUAN Yingqing², CAO Ni², MA Liuyang², DONG Xinli², XU Hai¹, JIAO Guiai²,
TANG Shaoqing^{2,*}, HU Peisong^{2,*}

(¹Shenyang Agricultural University, Shenyang 110011, China; ²China National Rice Research Institute, Hangzhou 311401, China; [#]These authors contributed equally to the work; ^{*}Corresponding author, email: tangshaoqing@caas.cn; peisonghu@126.com)

Abstract: [Objective] Weakened seed dormancy in rice leads to pre-harvest sprouting (PHS), which severely impacts grain yield and quality, making it crucial to investigate the genetic regulatory mechanisms underlying rice seed dormancy.

[Method] We generated loss-of-function mutants of the AP2/ERF transcription factor OsERF34 in the Zhonghua 11 (ZH11) background using CRISPR/Cas9 technology. **[Result]** The *oserf34* mutants exhibited severe pre-harvest sprouting and significantly reduced seed dormancy. Transcriptome analysis revealed that differentially expressed genes (DEGs) between *oserf34* and the wild type were significantly enriched in plant hormone signal transduction, ROS metabolism, and glycolytic pathways, suggesting that OsERF34 may maintain seed dormancy by regulating hormone biosynthesis/metabolism, redox homeostasis, and carbohydrate metabolism. Further investigation demonstrated that the *oserf34* mutant seeds showed substantially increased levels of auxin (IAA), gibberellins (GA19/GA20), and salicylic acid (SA), along with decreased proline content and elevated hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide anion level. Meanwhile, the activities of antioxidant enzymes (SOD, POD, CAT) were upregulated. Additionally, the mutant endosperm exhibited significantly elevated soluble sugar content and α -amylase activity, providing an energy foundation for dormancy release. This study demonstrates that OsERF34 positively regulates rice seed dormancy through its involvement in hormone biosynthesis/metabolism, redox homeostasis regulation, and carbohydrate metabolism.

[Conclusion] These findings provide novel theoretical insights and genetic resources for deciphering the molecular mechanisms of seed dormancy and germination, as well as for developing PHS-resistant rice varieties.

Key words: pre-harvest sprouting; dormancy; hormone metabolome; reactive oxygen species; soluble sugars; α -amylase

摘要: [目的] 水稻种子休眠性变弱会导致收获前穗发芽(PHS), 严重影响水稻的产量与品质, 因而研究水稻种子休眠性的遗传调控机制至关重要。**[方法]** 以中花 11 为背景通过 CRISPR/Cas9 技术创制水稻 AP2/ERF 转录因子 OsERF34 功能缺失突变体, 结合转录组、激素代谢组及生理生化分析, 解析其调控种子休眠的分子途径。**[结果]** 发现 *oserf34* 突变体种子穗发芽严重, 休眠性极显著减弱。转录组分析显示, *oserf34* 与野生型之间差异表达基因(DEGs)显著富集于植物激素信号转导、ROS 代谢及糖酵解通路, 表明 *OsERF34* 可能通过调控激素合成与代谢、氧化还原平衡及糖代谢, 维持种子休眠状态。进一步研究发现, *oserf34* 突变体种子中生长素(IAA)、赤霉素(GA19/GA20)及水杨酸(SA)含量显著升高, 而 ROS 清除剂脯氨酸含量降低, 过氧化氢(H₂O₂)和超氧阴离子积累加剧, 同时抗氧化酶(SOD、POD、CAT)活性上调。此外, 突变体胚乳中可溶性糖含量和 α -淀粉酶活性显著升高, 为打破休眠提供能量基础。**[结论]** *OsERF34* 通过参与激素合成与代谢、氧化还原平衡及糖代谢正向调控水稻种子休眠, 为解析水稻种子休眠与萌发分子机制及创制抗穗发芽水稻新品种提供了新的理论依据与遗传资源。

关键词: 穗发芽; 休眠; 激素代谢组; 活性氧; 可溶性糖; α -淀粉酶

收稿日期: 2025-04-24; 修改稿收到日期: 2025-06-03。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32172080); 国家自然科学基金基础科学中心项目 (32188102)。

水稻作为全球半数人口的主食作物, 其生产稳定性直接关系到粮食安全^[1]。在中低纬度水稻主产区, 高温多雨天气常导致收获前穗发芽(Pre-harvest Sprouting, PHS), 严重影响水稻千粒重, 并导致糙米率、精米率和整精米率下降, 不仅造成产量损失, 也显著降低加工品质和蒸煮品质。据统计, 我国南方稻区收获期易遇高温高湿天气, 穗发芽造成常规稻约 6% 栽培面积受灾, 而杂交稻受灾面积更是高达 20%。尤其在杂交稻制种过程中若遇阴雨天气, 会严重影响种子质量^[2]。长期以来, 我国南方稻区穗发芽问题一直未从根本上得到有效遏制。除了环境条件的影响外, 种子休眠性是决定穗发芽的最重要因素。随着全球极端天气事件频发, 解析种子休眠的遗传基础与分子调控网络, 挖掘关键调控基因并培育抗穗发芽新品种, 已成为保障粮食安全的迫切需求。

种子休眠与萌发的调控高度依赖种子内部多种激素的动态平衡。脱落酸(ABA)作为维持休眠的核心因子, 通过抑制胚根生长和细胞分裂维持休眠状态^[3], 其作用机制涉及激活 ABA 生物合成基因(如 *OsNCED1*)并抑制赤霉素(GA)信号通路^[4]。GA 具有促进种子萌发、释放休眠以及拮抗 ABA 的作用^[5-7]。GA 通过诱导 α -淀粉酶活性促进胚乳淀粉水解, 为萌发提供能量^[8]。GA 信号通过解除 DELLA 蛋白对 GAMYB 转录因子的抑制, 激活 α -淀粉酶基因(如 *RAmyS*)的表达, 驱动胚乳淀粉的降解^[9]。生长素(IAA)通过促进胚轴伸长打破休眠^[10]。细胞分裂素(CK)增强 GA 介导的淀粉酶活性^[11]; 水杨酸(SA)通过降低 ABA 含量并激活 β -淀粉酶, 促进低温下萌发^[12]。ABA/GA 平衡是调控休眠的关键节点^[13, 14]。但也有大量研究阐释了 GA 与 IAA、CK 和 SA 的互作关系^[15-17], 如 SA 通过上调 SOD 和 CAT 活性增强 ROS 清除能力, 间接调控 GA 等激素的稳态^[18]。

此外, 种子中 ROS 与游离糖的水平也影响着种子的休眠与萌发^[19-22]。研究发现, ROS 通过软化种皮、降低氧化酚类抑制物活性^[22], 并激活 GA 合成基因(如 *GA20ox* 和 *GA3ox*), 促进萌发^[21]。IAA 和 SA 也被报道可提高低温萌发过程中种子的脯氨酸以及 ROS 含量, 增加超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性^[12]。胚乳内的淀粉和游离糖作为能量的主要来源, 也是休眠调控的代谢信号^[20]。在种子发芽过程中, 淀粉在各种水解酶的协同作用下降解, 其中, α -淀粉酶是水稻中含量最丰富的水解酶。GA 诱导的 α -淀粉酶(RAmyS)在胚乳淀粉降解中起关键作用, 产生糊精和麦芽糖, 进一步转化为葡萄糖供胚生长^[23]。糖代谢异常(如 *OsCINI* 过表

达)会导致穗发芽^[24]。在对多种谷类作物的研究中, 除了 GA 通过分解贮存淀粉促进种子萌发外^[25], CK 也通过增强 GA 信号增强 α -淀粉酶活性促进小麦种子萌发^[8], SA 降低种子内源 ABA 含量, 增加 GA1 含量, 增强总淀粉酶和 β -淀粉酶活性, 促进相关基因的表达, 从而促进低温下的种子萌发^[13]。先前对大麦的研究显示, 伴随着 ABA 功能的转录下调, *Risø16* 谷物中缺乏胞质 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶会导致游离糖的激增^[26]。综上所述, 种子中植物激素含量、ROS 动态平衡及糖物质类代谢是调节植物种子调控休眠与萌发的主要因素。

另外, 水稻中已鉴定出多个种子休眠关键调控因子: *OsVP1* 通过 ABA 信号通路激活 *Sdr4* 表达以控制水稻种子休眠^[27], *Sdr4* 通过抑制活性 GA 合成及促进种子储藏物质积累来正调节种子休眠^[28]; *OsMFT2* 作为一个转录辅助因子, 与 *OsZIP23/66/72* 互作, 正调控 ABA 信号及 ABA 应答基因 *Rab16A* 的表达从而抑制种子萌发^[29]; *OsMFT1/2-OsbHLH004* 和 *OsMFT1/2-IPA1* 复合物受 *OsFTIP1* 介导拮抗调节 *OsNCED3* 和 *OsGA2ox6* 的表达, 从而调控种子休眠^[30]; *SD6* 和 *ICE2* 通过温度依赖的方式直接调控 ABA 分解代谢基因表达并间接影响 ABA 生物合成基因, 在种子休眠中发挥拮抗作用^[31]。

作为植物中主要的转录因子家族之一, APETALA2/Ethylene Responsive Factor(AP2/ERF)不仅能响应环境胁迫, 还能通过整合激素、ROS 及代谢信号影响植物生长发育^[32-35]。AP2/ERF 转录因子可以直接调控激素通路, 通过结合靶基因启动子的 GCC-box、DRE/CRT 等元件, 激活或抑制下游激素相关基因的表达, 调控种子休眠与萌发, 如 *OsAP2-39* 通过直接激活 ABA 生物合成基因(*OsNCED1*)和 GA 失活基因(*OsEUII*), 提高 ABA 水平的同时抑制 GA 活性, 维持高 ABA/GA 比以延长休眠^[36]。而有些转录因子则通过与其他调控蛋白(如激素信号元件、激酶等)互作, 形成复合调控模块, GA 信号通路中的负调控因子 *OsEATB*, 通过抑制 GA 生物合成基因 *OsCPS2*, 降低 GA 含量, 间接增强 ABA 信号, 限制节间伸长^[37], 另外, *OsERF44* 与 *OsABI5* 协同调控胚乳淀粉的代谢, 并受 ABA 信号调控影响种子穗发芽^[2, 38]。

尽管目前在 AP2/ERF 家族基因调控作物种子休眠与萌发的机理研究方面取得了一定的进展, 但由于种子休眠与萌发调控机制的复杂性, AP2/ERF 整合激素、活性氧及糖类代谢信号来调控种子休眠在很大程度上仍然未知。本研究发现 AP2/ERF 转录因子

OsERF34 为水稻种子休眠性的正调节因子,并发现它通过同时调控植物激素、ROS 平衡和糖代谢调控水稻种子的休眠性。该发现有助于我们深入理解水稻种子休眠性的分子调控网络,并为培育具有适当休眠特性、抗穗发芽的水稻品种提供新的遗传资源。

1 材料与方法

1.1 基因筛选

数据获取:从 NCBI 数据库下载例如 *OsMFT2*、*OsMFT1*、*IPA1*、*OsVP1*、*OsFTIP1*、*OsSdr4*、*OsSD6* 等休眠相关基因的 cDNA 序列和启动子序列信息;
预测分析:在 TDTHub 和 JASPAR 数据库粘贴下载的基因序列预测上游转录因子和 DNA 结合位点,根据结合位置、结合强度等信息选择适量的转录因子;
基因筛选:将多个休眠相关基因的上游转录因子预测结果进行综合分析,寻找共同的上游转录因子。从共同的上游转录因子中,挑选出多个基因作为深入研究的对象,分别构建突变体、筛选休眠表型,最终挑选出 *OsERF34* 作为研究对象。

1.2 试验材料

以粳稻品种中花 11 为遗传背景,由 CRISPR/Cas9 技术创建 *OsERF34* (*LOC_Os04g46440*)突变体,靶点序列为 GTCCTCGAGCCTCTCGTGCGGGG(*OsERF34*-CRISPR-F: AAGAAGTCGCGCATCTGGC; *OsERF34*-CRISPR-R: TACACGGAAGCATGACTGGC)。由江苏百格基因科技公司通过农杆菌 EHA105 介导法侵染愈伤组织得到转基因植株。共鉴定得到 2 个家系(鉴定引物 *OsERF34*-qF: AATGCCAAGAGCCCC; *OsERF34*-qR: GGCTTG TACATGGCGG)。本研究所用材料均取 T₃ 代稳定遗传材料进行测定,所有材料于 2024 年种植于杭州市中国水稻研究所实验基地(119.5°E, 30.0°N, 亚热带季风气候)。于 5 月 25 日左右播种,6 月 15 日左右移栽。插秧的行间距为 25 cm(行距)×10 cm(株距)。田间管理为正常水田管理。引物合成与测序由浙江尚亚生物技术有限公司和北京擎科生物科技有限公司完成。

1.3 新收获种子发芽率统计

收获授粉后 30 d 的水稻穗子,用 ddH₂O 清洗 3 遍,置于叠有两层滤纸的圆形培养皿中,始终保持滤纸处于湿润状态,置于培养箱中(30 °C, 80%的湿度, 12 h 光照/12 h 黑暗),每个株系取 5 个穗子。每天记录种子发芽数目,胚根长至种子的一半长或者胚芽长至种子的全长记为发芽。

共统计 7 d。

1.4 生物信息学分析

蛋白保守结构域:在 NCBI 网站找到目标基因的蛋白质序列信息,通过保守结构域(Conserve Domain)即可查找该蛋白的保守结构域。

1.5 转录组分析

将授粉后 20 d(DAP 20)的野生型和突变体种子收获后立即放入液氮中,使用植物 RNA 提取试剂盒(Tiangen, 北京)提取总 RNA;使用微量紫外-可见分光光度计(NanoDrop™ One/OneC)检测 RNA 纯度(OD₂₆₀/OD₂₈₀, OD₂₆₀/OD₂₃₀ 比值);荧光定量仪(Life Invitrogen Qubit® 4.0)采用荧光定量检测试剂盒(Qubit™ RNA HS Assay Kit)精确定量;在微流控芯片电泳自动化分析平台(Agilent 2100 TapeStation)系统精确检测 RNA 完整性(RIN 值)。样品检测合格之后,进行样品的文库构建,通过上述微流控芯片电泳自动化分析平台检测文库片段大小。库检合格后,将不同文库按其有效浓度及目标测序数据量的要求进行混合(pooling),随后使用 Illumina PE150 平台进行测序。将测序数据进行质控后,经过滤得到过滤后的高质量序列(clean reads),将这些序列比对到参考序列,采用 STAR(<https://github.com/alexdobin/STAR>)对过滤后的数据进行参考基因组的比对分析。使用 DESeq 2 进行差异表达分析,并采用 Benjamini-Hochberg 方法对 *P* 值进行校正以控制错误发现率。由 DESeq 2 分析的校正后 *P* 值<0.01 和倍数变化≥2 的基因定义为差异表达。使用 clusterProfiler 包进行差异表达基因的 GO 富集分析。使用 KOBAS 数据库和 clusterProfiler 软件来分析 KEGG 通路中差异表达基因的富集情况。

1.6 激素类目标代谢物分析

将授粉后 20 d(DAP 20)的野生型和突变体种子收获后立即放入液氮中,参考 Li Yan 和 Flokova 的方法提取种子中的激素代谢物。采用超高效液相色谱(Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC, ExionLC™ AD)对目标化合物进行色谱分离,采用串联质谱(Tandem Mass Spectrometry, MS/MS, QTRAP® 6500+)进行质谱分析。采用 Analyst 1.6.3 软件和 MultiQuant 3.0.3 软件处理质谱数据。通过标准曲线计算样品中植物激素物质的绝对定量结果。

1.7 生理指标测定

1.7.1 脯氨酸(PRO)和 ROS 含量测定

取野生型和突变体授粉后 20 d 的种子各 0.1 g,按照相应试剂盒说明书进行测定。脯氨酸(PRO)、

过氧化氢(H_2O_2)、超氧阴离子($O_2 \cdot^-$)含量分别使用苏州格锐思生物科技有限公司的试剂盒(货号: G0111W, G0168W, G0116W)进行测定。

1.7.2 抗氧化酶活性测定

超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)含量测定分别使用 BOXBIO 公司的试剂盒(货号: AKAO001M-50S, AKSU001C, AKSU001M), 按说明书操作。取野生型和突变体授粉后 20 d 的种子各 0.1 g, 加入液氮研磨成粉末后加入 1 mL 提取液, 12000×g 下离心 10 min, 上清液用于测定酶活。分别根据相应试剂盒说明书配制测定管, 利用酶标仪在相应的波长测定吸光度, 并计算出酶活性。

1.7.3 可溶性糖含量和 α -淀粉酶测定

可溶性糖含量和 α -淀粉酶的测定分别使用苏州格锐思生物科技有限公司的试剂盒(货号: G0501W, G0510W)进行, 按说明书操作。取野生型和突变体授粉后 20 d 的种子各 0.1 g, 按照相应

试剂盒说明书进行测定。

1.8 数据统计与分析

使用 Microsoft Excel 97-2003 和 GraphPad Prism 8 进行数据统计和作图。

2 结果与分析

2.1 *OsERF34* 促进水稻种子休眠

为了挖掘水稻休眠的关键调控候选基因, 我们通过数据库预测筛选出多个休眠相关基因(*OsVPI*、*OsFTIP1*、*Sdr4* 等)的上游转录因子, 并使用 CRISPR/Cas9 技术在中花 11 背景下创制了部分相关突变体。序列分析显示, *OsERF34* 的外显子上有两种突变方式。*OsERF34-1* 的外显子上插入了一个胸腺嘧啶碱基(T), *OsERF34-2* 的外显子上缺失了一个胞嘧啶、一个胸腺嘧啶和两个鸟嘌呤共 4 个碱基(CTCG), 这两种突变方式均导致了移码突变。穗萌发试验结果显示, 相较于野生型, *oserf34* 突变体种

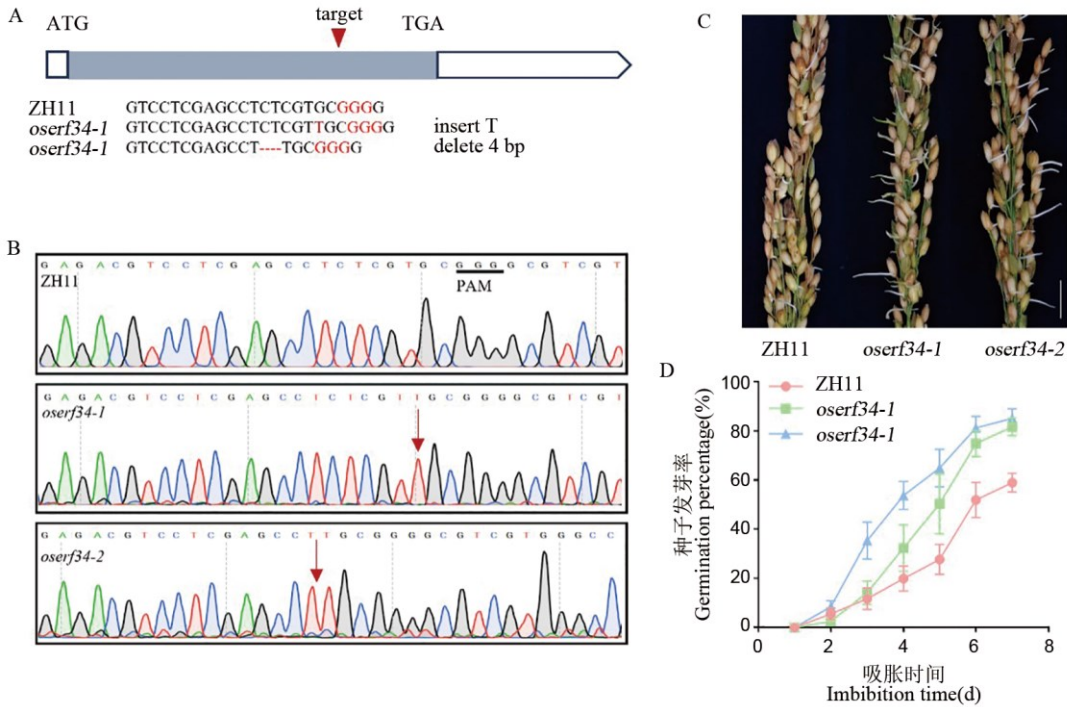
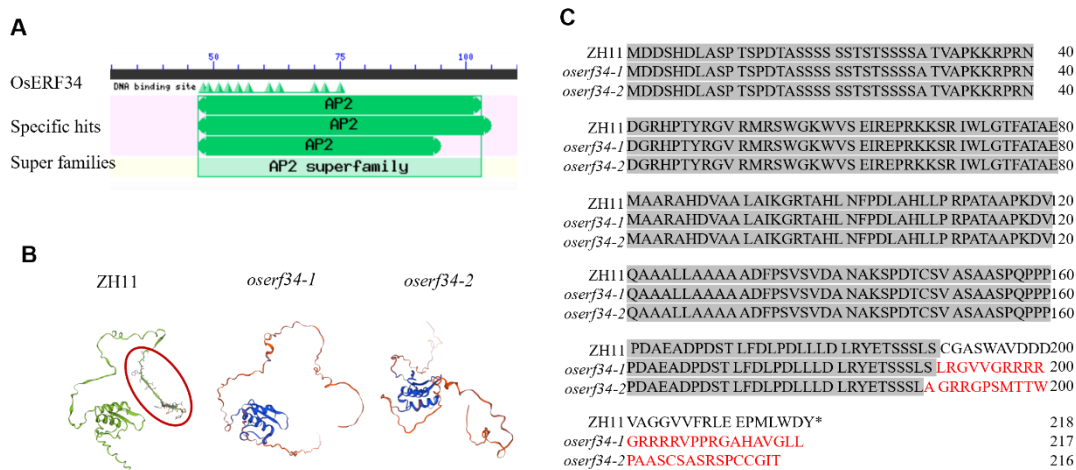


图 1 *oserf34* 突变体种子休眠性减弱

Fig. 1. The *oserf34* mutant exhibits a weaker dormancy phenotype



A: NCBI 网站分析 *OsERF34* 的蛋白保守结构域。B: SWISS-MODEL 分析 *OsERF34* 突变前后的蛋白三级结构。红色圆圈表示变化的氨基酸位置。C: *OsERF34* 突变后氨基酸序列的改变，红色字体表示变化的氨基酸。

A, Conserved protein domains of *OsERF34* identified using the NCBI database. B, Tertiary protein structures of *OsERF34* before and after mutation analyzed using SWISS-MODEL. Red circles indicate positions of altered amino acids. C, Changes in the amino acid sequence of *OsERF34* post-mutation. Amino acids modified by the mutation are highlighted in red.

图2 *OsERF34* 的蛋白保守结构域及三维结构

Fig. 2. Analysis of conserved protein domains and tertiary structure in *OsERF34*

子的休眠性显著降低，检测野生型和突变体中不同发芽率株系中 *OsERF34* 的表达量发现，*oserf34-1* 和 *oserf34-2* 株系中该基因的表达量均显著下降，*oserf34* 是一个易穗萌的突变体，*oserf34-2* 的表达量更低导致其休眠性更差，穗萌发更严重。表明 *OSERF34* 可能是种子休眠的正调控因子。

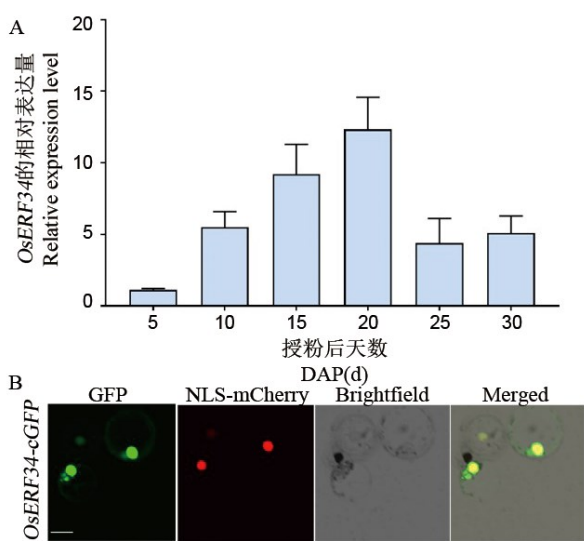
2.2 *OsERF34* 的蛋白保守结构域及三维结构分析

为了研究 *OsERF34* 的蛋白功能，我们对该蛋白的保守结构域进行了分析。如图 2-A 所示，在该蛋白的 47-105 位氨基酸处具有典型的 AP2 结构域，说明 *OsERF34* 编码一个 AP2/ERF 家族的转录因子。

蛋白质三维结构分析显示(图 2-B、C)，突变后 *OsERF34-2* 蛋白的 α 螺旋与 β 折叠区域发生明显构象改变，暗示该突变方式导致蛋白质功能的缺失。

2.3 *OsERF34* 的表达模式与亚细胞定位

为了解析 *OsERF34* 的表达模式，我们利用 qRT-PCR 检测了其在水稻发育籽粒中的表达水平，结果显示，*OsERF34* 在胚乳中表达量均较高，授粉后 20 d(DAP20)的种子中表达量最高。接着我们将去掉终止密码子的编码序列融合到 GFP 前面获得 35S:*OsERF34-GFP* 载体，并和核定位标记共同转化水稻原生质体来观察 *OsERF34* 的亚细胞定位情况。如图 3-B 所示，*OsERF34-GFP* 的绿色荧光信号与细胞核标记蛋白 Nuclear localization signal (NLS)-mCherry 的红色荧光信号完全重叠，表明 *OsERF34* 蛋白在细胞核中发挥功能。

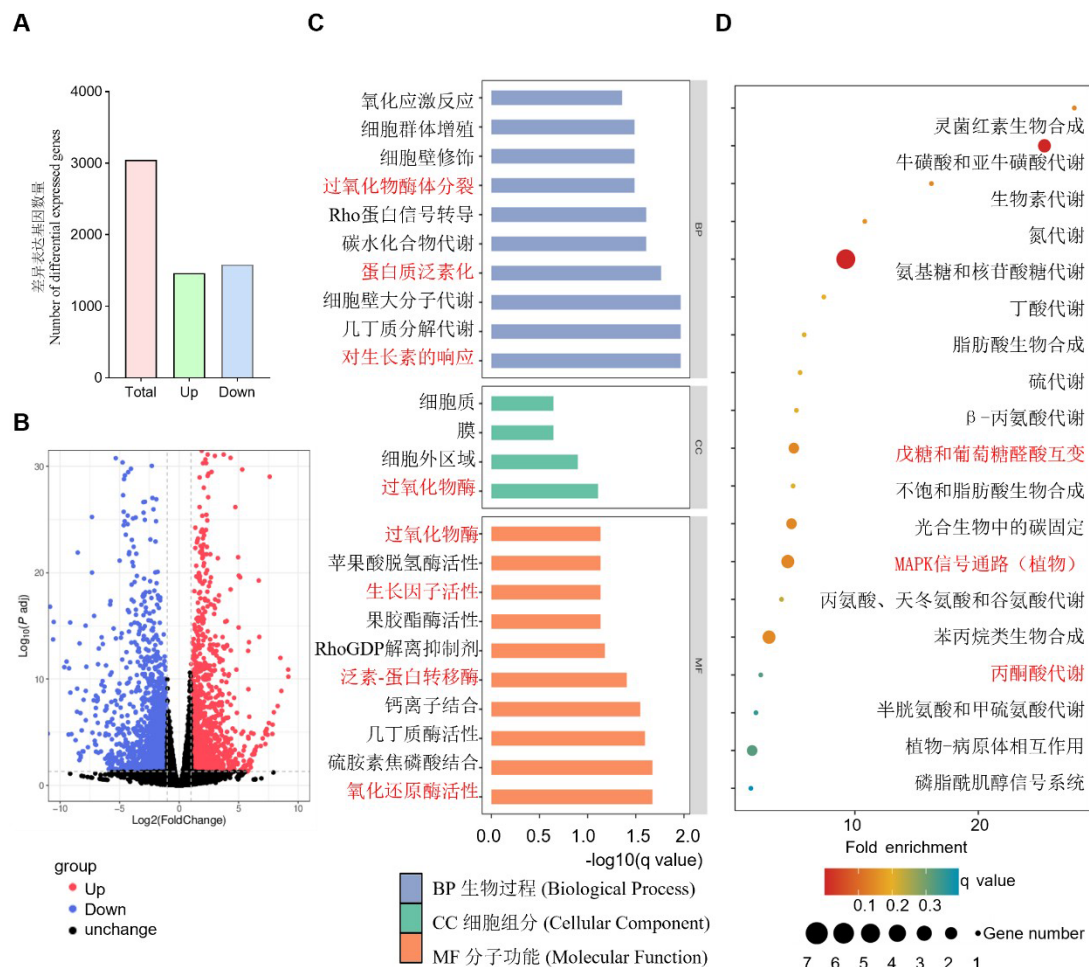


A: 使用 qRT-PCR 检测 *OsERF34* 在中花 11 不同授粉天数种子中的相对表达量，以 *Ubi* 基因的表达量为内参进行标准化，将 DAP5 的表达量设为 1，数值代表平均值 $\pm$ 标准差，生物学重复 3 次。B: *OsERF34-GFP* 在水稻原生质体中的亚细胞定位。将 *OsERF34-GFP* 和细胞核定位的 Nuclear localization signal (NLS)-mCherry 共转进水稻原生质体。GFP，绿色荧光蛋白，标尺=10 μ m。

A, Relative expression levels of *OsERF34* in Zhonghua11 seeds at different days after pollination (DAP) analyzed by qRT-PCR. Expression levels were normalized to the *Ubi* gene as an internal control, with the DAP5 value set to 1. Data represent mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$). B, Subcellular localization of *OsERF34-GFP* in rice protoplasts. *OsERF34-GFP* and nuclear-localized NLS-mCherry were co-transfected into rice protoplasts. GFP, Green fluorescent protein. Scale bar: 10 μ m.

图3 *OsERF34* 在不同发育时期种子中的表达模式及亚细胞定位

Fig. 3. Expression patterns in seeds at different developmental stages of *OsERF34* and its subcellular localization



A: *Oserf34* 与中花 11 差异表达基因的数目。B: *oserf34* 与中花 11 授粉后 20 d 种子的总基因表达谱火山图。C: DEGs 的 GO 富集中显著性排名前 20 的功能分析($P_{adj} < 0.05$)。D: DEGs 的 KEGG 富集中显著性排名前 20 的通路分析。
A, Number of differentially expressed genes (DEGs) between *oserf34* and Zhonghua11. B, Volcano plot of global gene expression profiles in seeds of *oserf34* and Zhonghua11 at 20 days after pollination (DAP). C, Gene Ontology (GO) enrichment analysis of DEGs, showing the top 20 significantly enriched functional terms ($P_{adj} < 0.05$). D, KEGG pathway enrichment analysis of DEGs, displaying the top 20 significantly enriched pathways.

图 4 *Oserf34* 和中花 11 的转录组测序分析

Fig. 4. Transcriptome sequencing analysis of *oserf34* and Zhonghua11

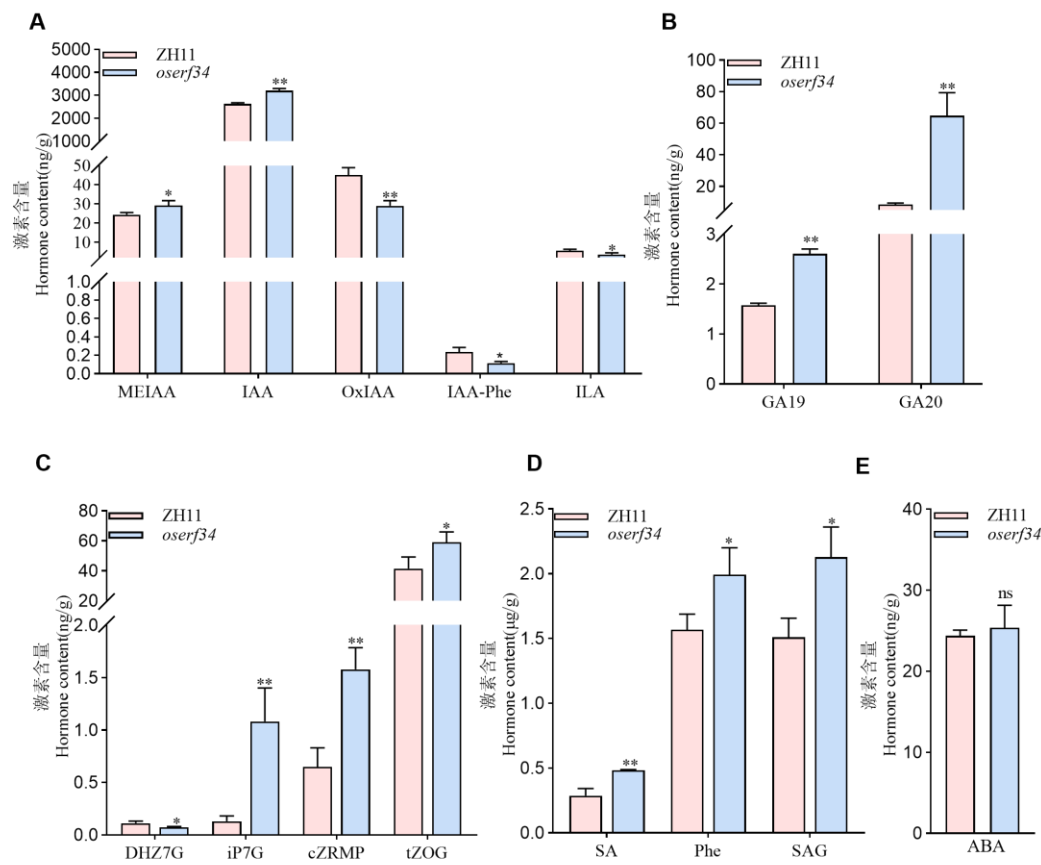
2.4 *OsERF34* 的转录组分析

为了深入解析 *OsERF34* 正调控水稻休眠的分子机理, 我们使用比较转录组测序(RNA-seq)对 *oserf34* 和中花 11 授粉后 20 d(DAP20)的水稻种子的转录组进行分析。同时以显著差异($P < 0.05$), 绝对倍数变化 ≥ 2 作为标准来鉴定差异表达基因。图 4-A~B 显示, 从转录组测序的结果中共鉴定到 3047 个在 *oserf34* 和中花 11 之间差异表达的基因, 其中有 1467 个基因在突变体中上调表达, 1580 个基因下调表达, 表明在种子成熟过程中 *OsERF34* 的功能缺失突变会引起大量基因的差异表达。对 DEGs 进行 GO 功能注释, 分别有 677、209 和 1126 个 DEGs 注释到生物学过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)三大类别中。BP 富集的主要为氧化反应、过氧化物酶、激素的响应和蛋白质泛素化等; CC 主

要为过氧化物酶等; 与 MF 相关的主要为过氧化物酶、氧化还原酶和泛素-蛋白质转移酶活性等(图 4-C)。通过 KEGG 数据库对 DEGs 的通路注释分析, 从代谢途径寻找与目标基因相关的代谢通路。图 4-D 呈现了显著性 q 值最小的前 20 个代谢通路, 显著性富集的代谢通路包括各类物质的合成与代谢, 如氨基酸和核苷酸糖代谢、丙酮酸代谢等; 重要的是我们观察到通路中涉及 MAPK 信号通路, MAPK 为丝裂原活化蛋白激酶, 此通路参与很多生理过程, 包括激素的调控、磷酸化和种子的休眠。说明在种子成熟前期, 突变体在能量代谢和激素等方面进行了调节以降低种子的休眠性。

2.5 *OsERF34* 的代谢组分析

转录组学的数据分析结果显示, 部分差异显著基因集中在植物激素信号转导上, 过往有大量的研



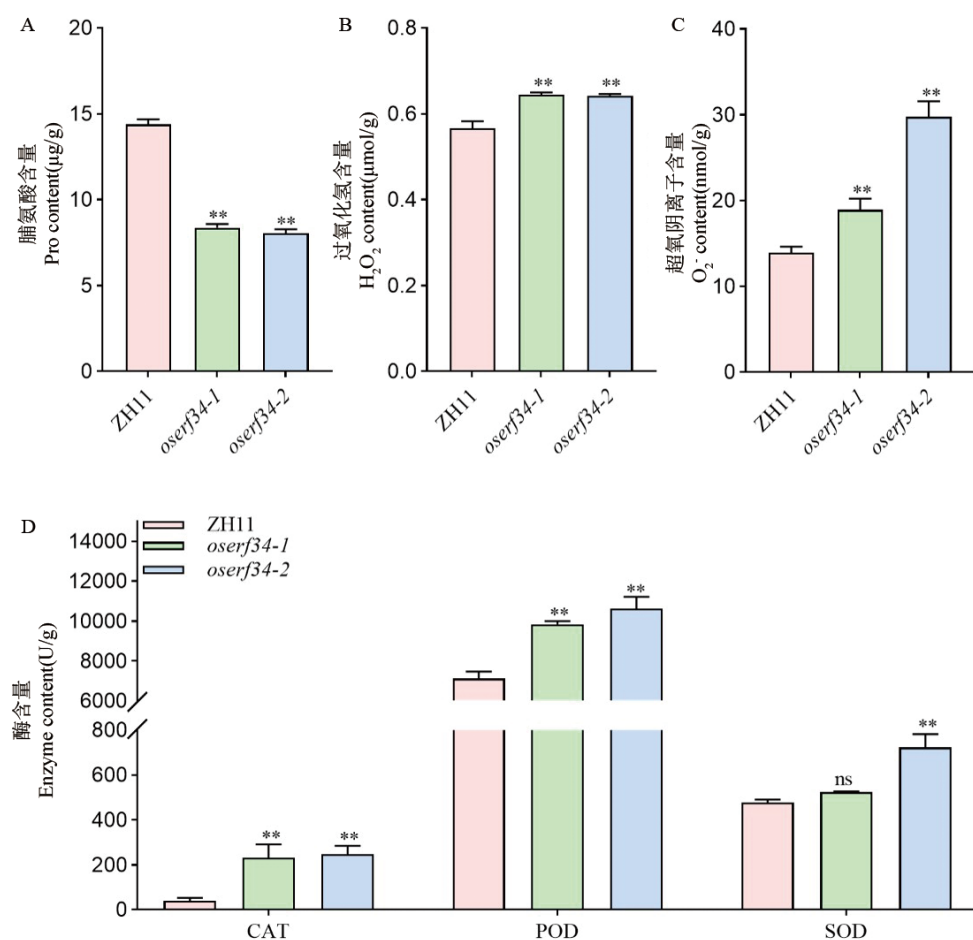
A: 授粉后 25 d 中花 11 和 *oserf34* 中生长素类激素的含量。MEIAA: 吲哚-3-乙酸甲酯; IAA: 生长素; OxIAA: 氧化吲哚乙酸; IAA-Phe: N-(3-吲哚乙酰基)-L-苯丙氨酸; ILA: 吲哚-3-乳酸。B: 授粉后 25 d 中花 11 和 *oserf34* 赤霉素类激素的含量。GA19: 赤霉素 19; GA20: 赤霉素 20。C: 授粉后 25 d 中花 11 和 *oserf34* 细胞分裂素类激素的含量。DHZ7G: 双氢玉米素-7-葡萄糖苷; iP7G: 异戊烯腺嘌呤-7-葡萄糖苷; cZRMP: 顺式玉米素-糖苷磷酸盐; tZOG: 反式-玉米素-9-B-葡萄糖苷。D: 授粉后 25 d 中花 11 和 *oserf34* 水杨酸类激素的含量。SA: 水杨酸; Phe: L-苯丙氨酸; SAG: 水杨酸-2-O-β-葡萄糖苷。数值代表平均值±标准差 (n=3)。E: 授粉后 25 d 中花 11 和 *oserf34* 中脱落酸 (ABA) 含量。野生型中花 11 和突变体 *oserf34* 之间进行差异比较分析, **代表在 $P < 0.01$ 水平上存在显著差异, *代表在 $P < 0.05$ 水平上存在显著差异(学生氏 t 检验)。

A, Auxin content in Zhonghua11 and *oserf34* at 25 days after pollination. MEIAA, Methyl indole-3-acetate; IAA, Indole-3-acetic acid; OxIAA, 2-oxindole-3-acetic acid; IAA-Phe, N-(3-Indolylacetyl)-L-phenylalanine; ILA, Indole-3-lactic acid. B, Gibberellin content in Zhonghua11 and *oserf34* at 25 days after pollination. GA19, Gibberellin A19; GA20, Gibberellin A20. C, Cytokinin content in Zhonghua11 and *oserf34* at 25 days after pollination. DHZ7G, Dihydrozeatin-7-glucoside; iP7G, N6-Isopentenyl-adenine-7-glucoside; cZRMP, *cis*-Zeatin riboside monophosphate; tZOG, trans-Zeatin-O-glucoside. D, Salicylic acid content in Zhonghua 11 and *oserf34* at 25 days after pollination. SA, Salicylic acid; Phe, L-Phenylalanine; SAG, Salicylic acid 2-O-β-glucoside. E, ABA content in Zhonghua 11 and *oserf34*. Differential comparative analysis between Zhonghua 11 and *oserf34*, error bars represent SD ($n = 3$). **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$ (Student's t -test).

图 5 中花 11 和 *oserf34* 激素含量的分析
Fig. 5. Analysis of hormone contents between Zhonghua11 and *oserf34*

究结果表明各种植物激素与种子的休眠强度紧密联系。进一步选取野生型中花 11 和穗萌表型强的突变体 *oserf34-2* 授粉后 20 d 的种子, 基于 LC-MS/MS 平台对中花 11 和 *oserf34* 的各种内源激素进行实验测定。与野生型相比, 突变体的生长素(吲哚-3-乙酸 IAA)含量极显著升高, 而生长素类物质吲哚-3-乙酸甲酯(MEIAA)、氧化吲哚乙酸(OxIAA)、N-(3-吲哚乙酰基)-L-苯丙氨酸(IAA-Phe)和吲哚-3-乳酸(ILA)含量也都有显著或极显著的改变; 赤霉素(GA19 和 GA20)和水杨酸均极显著升

高, 水杨酸相关物质 L-苯丙氨酸(Phe)和水杨酸-2-O-β-葡萄糖苷(SAG)含量也显著增加; 细胞分裂素类物质除了双氢玉米素-7-糖苷(DHZ7G)含量显著降低外, 其他三种物质异戊烯腺嘌呤-7-葡萄糖苷(Ip7g)、顺式玉米素-糖苷磷酸盐(cZRMP)和反式-玉米素-9-B-葡萄糖苷(tZOG)含量均有显著或极显著的增加。脱落酸(ABA)的含量在野生型和突变体之间没有显著的差异, 说明 *OsERF34* 主要影响生长素和赤霉素含量, 并协同调控其他多种激素, 共同影响水稻种子的休眠性。



A: ZH11 和 *oserf34* 授粉后 20 d 的种子中脯氨酸含量。B: ZH11 和 *oserf34* 授粉后 20 d 的种子中过氧化氢含量。C: ZH11 和 *oserf34* 授粉后 20 d 的种子中超氧阴离子含量。D: ZH11 和 *oserf34* 授粉后 20 d 的种子中 ROS 清除酶含量。数值代表平均值±标准差 ($n=3$)。野生型 ZH11 和突变体 *oserf34* 之间进行差异比较分析, **代表在 $P < 0.01$ 水平上存在显著差异, *代表在 $P < 0.05$ 水平上存在显著差异, t 检验。

A, Determination of proline content in seeds of ZH11 and *oserf34* at 20 days after pollination (DAP). B, Determination of hydrogen peroxide (H_2O_2) content in seeds of ZH11 and *oserf34* at 20 DAP. C, Determination of superoxide anion content in seeds of ZH11 and *oserf34* at 20 DAP. D, Determination of ROS-scavenging enzyme activities in seeds of ZH11 and *oserf34* at 20 DAP. Differential comparative analysis between wild-type ZH11 and mutant *oserf34*, error bars represent SD ($n = 3$). **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$, Student's t -test.

图 6 ZH11 和 *oserf34* 活性氧途径分析

Fig. 6. Analysis of reactive oxygen species pathways between ZH11 and *oserf34*

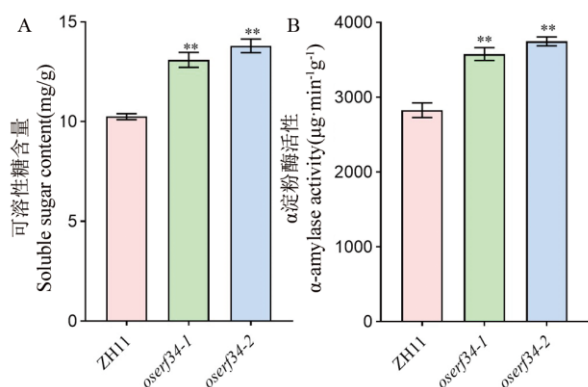
2.6 OsERF34 调节种子活性氧平衡

ROS 通过影响植物激素途径、蛋白质功能、基因表达以及与其他信号分子的相互作用,精准地调节种子的休眠状态和萌发,在前期转录组分析中部分差异基因富集在氧化还原途径,为了进一步验证此结果,明确 *OsERF34* 调控种子休眠的机理,我们对 ROS 相关的指标进行了测定,如图 6-A 所示,活性氧的清除剂脯氨酸在突变体中的含量显著低于野生型,相对应地,其过氧化氢含量和超氧阴离子含量显著增加(图 6-B、C),对过氧化物酶 CAT、POD 和 SOD 的内源含量分析表明,与 ZH11 相比,

oserf34-2 的 CAT、POD、SOD 的含量均显著增加,*oserf34-1* 的 CAT、POD 含量也显著增加, SOD 含量虽然也是增加的趋势,但没有达到显著水平(图 6-D)。这些结果表明,ROS 参与 *OsERF34* 对休眠的调控过程。

2.7 Oserf34 中可溶性糖含量增加

转录组代谢通路分析显示,种子萌发过程中糖酵解(glycolysis)和糖类代谢相关通路有较多基因富集。基于 α -淀粉酶介导的淀粉降解是种子能量供应的核心机制,本研究进一步检测了可溶性糖含量及 α -淀粉酶活性,结果表明突变体中可溶性糖含量和



A: 授粉后 20 d 的种子中可溶性糖含量的测定。B: 授粉后 20 d 的种子中 α -淀粉酶活性的测定。数值代表平均值 $\pm$ 标准差 ($n=3$)。**代表野生型 ZH11 和突变体 *oserf34* 在 $P<0.01$ 水平上存在显著差异, *代表在 $P<0.05$ 水平上存在显著差异(t 检验)。

A, Measurement of soluble sugar content in seeds at 20 days after pollination (DAP). B, Measurement of α -amylase activity in seeds at 20 days after pollination (DAP). Differential comparative analysis between ZH11 and *oserf34*, error bars represent SD ($n=3$). **, $P<0.01$; *, $P<0.05$ (Student's t -test).

图 7 ZH11 和 *oserf34* 糖代谢相关指标分析

Fig. 7. Analysis of sugar metabolism-related parameters in ZH11 and *oserf34*

α -淀粉酶活性均显著高于野生型, 这与突变体 *oserf34* 的易穗萌表型相吻合。说明 *OsERF34* 也通过糖类物质代谢途径调控种子休眠。

2.8 *Oserf34* 主要产量性状变化

我们考察了正常生长条件下, 突变体和野生型植株的田间农艺性状。如图 8 所示, 与野生型相比, 突变体的株高极显著降低; 千粒重也呈下降趋势, 且 *oserf34-2* 达到极显著水平。另外, 突变体的分蘖数、每穗粒数和结实率均无显著变化。说明 *OsERF34* 参与部分水稻重要农艺性状的调控。

3 讨论

3.1 AP2 家族基因在休眠过程中的作用

穗发芽受到涉及种子休眠基因的信号网络的复杂调节。转录因子 AP2/ERF 家族基因在种子休眠调控中展现出功能多样性, 本研究发现, *OsERF34* 编码一个包含 AP2/ERF 结构域的转录因子, 其突变体植株表现出穗发芽表型, 暗示其作为正调控因子参与水稻休眠调控途径, 这与其同家族的休眠负调控因子 *OsERF44* 不同。另外, 拟南芥中编码 AP2 转录因子的基因 *ABI4* 和大豆中的 *GmSGR*, 均通过整合 ABA 与糖信号响应种子休眠^[39-41]。这一发现拓展了 AP2/ERF 家族的功能边界, 强调了基因功能在物种和通路中的特异性。作为同一个家族成员,

AP2/ERF 转录因子有着相似的蛋白结构域, 但不同基因通过特异的途径影响种子休眠, 其激素、活性氧和糖类物质等的互作途径多样且复杂。因此, 挖掘新基因的功能并研究其调控机制, 对完善 AP2 家族基因功能有重要的意义。

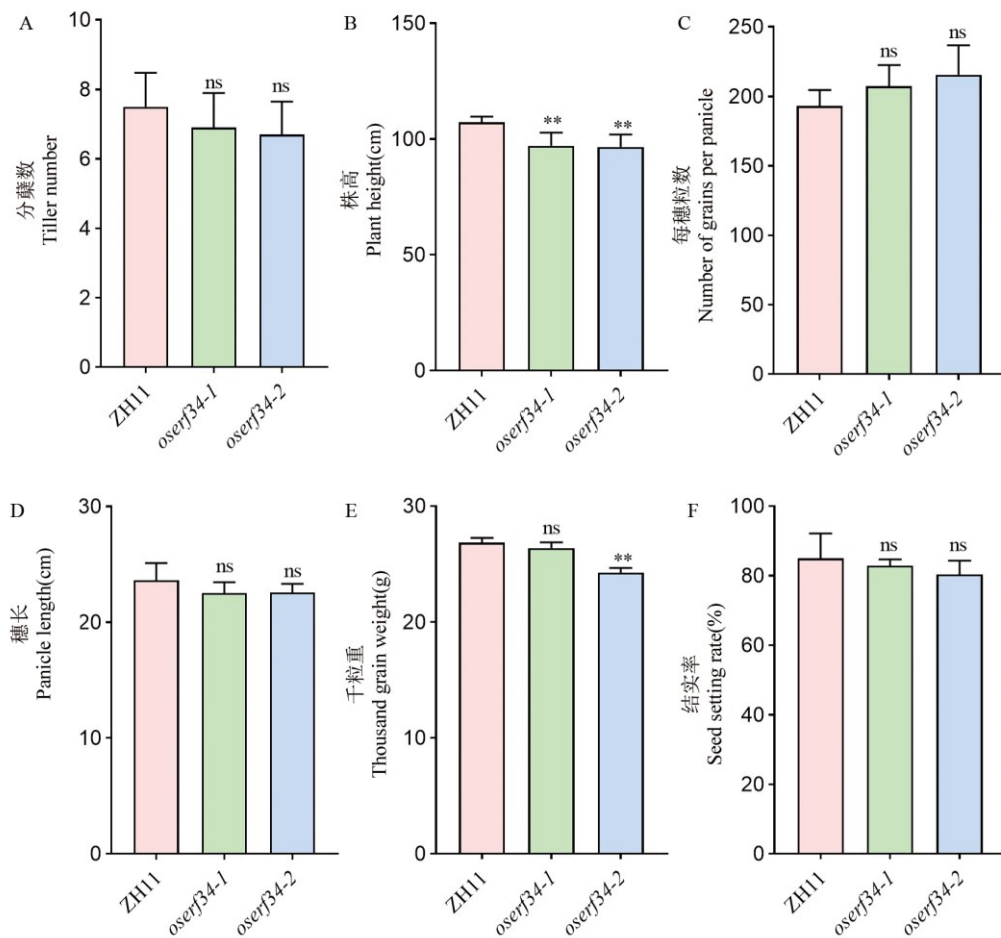
3.2 激素对休眠的影响

GA 和 ABA 的拮抗作用是调控种子休眠的核心机制^[42, 43]。其中, GA 可以打破种子休眠, 促进发芽, 而 ABA 则起抑制作用 *oserf34* 突变体中 GA 含量显著升高, 而 ABA 水平未显著变化, 暗示 *OsERF34* 可能通过抑制 GA 合成或促进其降解失活维持休眠。

IAA 在休眠调控中呈现浓度依赖性: 低浓度促进萌发, 高浓度抑制, 且 IAA 浓度的敏感性因植物不同而异^[44]。例如, 生长素的外源施用可增强拟南芥中 ABA 对种子发芽的抑制^[45, 46], 也可以抑制成熟期小麦种子的穗发芽^[47]。本研究中, *oserf34* 突变体 IAA 水平升高, 促进了穗发芽的发生, 可能是通过激活胚轴伸长相关基因(如 *ARF10/16/17*)^[48]打破休眠。ARF10、ARF16 和 ARF17 作为生长素信号传导途径中的重要转录因子, 在拟南芥中受 *MIRNA160* 的直接调控而影响休眠水平^[46, 49, 50]。*IAA7/AXR2* 和 *IAA17/AXR3* 是 TIR1/AFB 调节生长素信号途径中两个特征明显的转录抑制子^[48, 51], 这些基因在我们的转录组分析中也有显著差异, 表明 *OsERF34* 影响生长素代谢途径。IAA 与 GA 的相互影响也多有报道, 例如在 *gal* 突变体中, GA4 处理显著上调 IAA 运输载体基因 *AUX1*、*PIN2* 和 *PIN7* 的表达^[52]。此外, 我们的突变体中 CK 和 SA 的含量也有显著增加, 据报道, CK 可以通过激活信号通路(如 *ARR1* 的磷酸化)增强 GA 的响应, 促进萌发相关基因表达(如淀粉酶合成), 提高种子内还原糖含量, 为萌发提供条件^[53]。IAA 信号和 CK 信号通过调控 *ARR7/ARR15* 影响植物顶端分生组织^[54]。SA 通过抑制受 GA 诱导的 α -淀粉酶基因(*Amy32b*)的表达来抑制萌发^[55]。正如上述很多前人的研究结果, 本研究中 *OsERF34* 对激素的影响是复杂的, 突变体 *oserf34* 中 IAA、GA、CK 和 SA 之间复杂的互作关系, 直接或间接地加剧了穗发芽的发生。

3.3 ROS 对休眠的影响

ROS 既是种子萌发启动信号, 也是氧化损伤因子^[56-59]。当种子中 ROS 浓度过高时, 会引起氧化损伤, 影响种子萌发, 只有适宜的 ROS 浓度, 才能增强 GA 合成基因和抗氧化酶活性相关基因的表达, 起到打破种子休眠的作用。突变体 *oserf34* 中 H_2O_2 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 含量显著升高, 抗氧化酶 POD、CAT



A-D: ZH11 和 *oserf34* 分蘖数 (A), 株高 (B), 每穗粒数 (C) 和穗长 (D)。柱状图代表平均值±标准差 ($n=10$)。E-F: 千粒重 (E) 和结实率 (F)。柱状图代表平均值±标准差 ($n=3$)。**代表野生型 ZH11 和突变体 *oserf34* 在 $P<0.01$ 水平上存在显著差异, ns 代表无显著差异(t 检验)。
A-D, Tiller number(A), plant height(B), grains per panicle(C), and panicle length(D) of ZH11 and *oserf34*. Bar graphs represent mean±SD($n=10$). E-F, 1000-grain weight (E) and seed setting rate(F). Values are means±SD($n=3$). ** and "ns" indicate extremely significant differences (Student's t -test, $P<0.01$) and no significant difference between ZH11 and *oserf34*, respectively.

图 8 田间农艺性状统计

Fig. 8. Statistical analysis of agronomic traits in field conditions

和 SOD 活性也随之显著增强, 提示 *OsERF34* 通过维持 ROS 稳态抑制穗发芽。据报道, ROS 影响休眠的途径多与植物激素有关, H_2O_2 降解 ABA、激活 GA、氧化种皮与胚乳的结构, 促进 GA 积累, 启动 GA 合成基因(如 *GA20ox* 和 *GA3ox*)等萌发相关基因的表达^[18]。SA 水平的增加可以诱导细胞质中的氧化还原变化^[60], SA 在正常条件下会增加 ROS 介导的氧化损伤, 并诱导 H_2O_2 和脯氨酸的产生, 对打破种子休眠产生不利影响; 在胁迫条件下, SA 可以充当抗氧化剂来清除植物体内的 ROS, 减少氧化损伤, 促进种子萌发^[61, 62]。本研究中突变体的 GA 和 SA 含量均显著上升, 根据前人研究推测 *OsERF4* 的功能失活导致氧化系统紊乱, ROS 含量上升, 增强了 GA 合成基因表达的同时, 诱导 SA

大量产生以减少氧化损伤。综上, *OsERF34* 可能以活性氧作为核心信号枢纽, 通过协调植物激素互作网络, 影响种子的休眠与萌发。

3.4 淀粉和可溶性糖对休眠的影响

胚乳糖代谢是休眠解除的能量基础^[63]。突变体 *oserf34* 中可溶性糖和 α -淀粉酶活性显著升高, 与 *PHS8* 突变体表型一致^[24]。*OsERF34* 可能通过直接抑制淀粉酶基因表达或激素代谢反馈调节的途径调控糖代谢。大量报道揭示了 GA 与 α -淀粉酶的密切关系, 如 GA 诱导的 α -淀粉酶主导淀粉降解, 生成葡萄糖供胚生长^[64], 糖代谢异常(如 *OsCINI* 过表达)会导致 *PHS*^[65]。除了 GA 含量显著增加外, 我们的突变体中 SA、IAA 和 ROS 含量均显著增加。据报道, *IPA1* 可通过 GA 途径干扰淀粉代谢(可溶

性糖含量和 α -淀粉酶)负向调节水稻的早期幼苗发育^[66], SA 对 GA 诱导的糊粉细胞中 α -淀粉酶的生物合成和种子萌发也具有拮抗作用, NADPH 氧化酶产生的 ROS 通过胚胎和糊粉细胞中的 GA/ABA 代谢和信号传导调节大麦种子萌发^[67]。这些结果共同表明, *OsERF34* 通过整合激素信号、ROS 平衡及糖代谢通路, 形成复杂的调控网络, 维持种子休眠状态。

总之, 本研究将 *OsERF34* 基因确定为水稻种子休眠的正调控因子, 并分析了突变体 *oserp34* 激素、ROS 和可溶性糖等代谢物的变化, 这种错综复杂的互作关系协同调控水稻种子的休眠。后期将对本研究涉及代谢通路中主要基因进行定量检测, 并进一步探究 *OsERF34* 下游靶基因及其互作网络, 以完善激素-代谢-环境信号协同调控种子休眠的分子模型。

参考文献:

- [1] Muthayya S, Sugimoto J D, Montgomery S, Maberly G F. An overview of global rice production, supply, trade, and consumption[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2014, 1324: 7-14.
- [2] 储零逸. AP2/ERF 转录因子 OsERF44 调控水稻穗发芽的效应及其机制研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
Chu L Y. Effect and mechanism of AP2/ERF transcription factor OsERF44 on panicle sprouting in rice[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2021. (in Chinese with English abstract)
- [3] 左志梅, 赵凯, 朱海山. 外源 ABA 对不同品种番茄种子萌发的影响[J]. 长江蔬菜, 2014(18): 35-38.
Zuo Z M, Zhao K, Zhu H S. Effects of exogenous abscisic acid on germination of different tomato cultivar seeds[J]. *Journal of Changjiang Vegetables*, 2014(18): 35-38. (in Chinese with English abstract)
- [4] Nonogaki H, Bassel G W, Bewley J D. Germination: Still a mystery[J]. *Plant Science*, 2010, 179(6): 574-581.
- [5] Bewley J D. Seed germination and dormancy[J]. *The Plant Cell*, 1997: 1055-1066.
- [6] Graeber K, Nakabayashi K, Miatton E, Leubner-Metzger G, Soppe W J J. Molecular mechanisms of seed dormancy[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2012, 35(10): 1769-1786.
- [7] Nonogaki H. Seed dormancy and germination emerging mechanisms and new hypotheses[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 233.
- [8] Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C. Molecular aspects of seed dormancy[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 387-415.
- [9] Sutoh K, Washio K, Imai R, Wada M, Nakai T, Yamauchi D. An N-terminal region of a Myb-like protein is involved in its intracellular localization and activation of a gibberellin-inducible proteinase gene in germinated rice seeds[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2015, 79(5): 747-759.
- [10] Finch-Savage W E, Leubner-Metzger G. Seed dormancy and the control of germination[J]. *New Phytologist*, 2006, 171(3): 501-523.
- [11] Del Bel Z, Andrade A, Lindström L, Alvarez D, Vigliocco A, Alemano S. The role of the sunflower seed coat and endosperm in the control of seed dormancy and germination: Phytohormone profile and their interaction with seed tissues[J]. *Plant Growth Regulation*, 2024, 102(1): 51-64.
- [12] 陈兵先, 张琪, 戴彰言, 周旭, 刘军. 水杨酸引发提高低温下水稻种子萌发活力的生理与分子效应[J]. 中国农业科学, 2024, 57(7): 1220-1236.
Chen B X, Zhang Q, Dai Z Y, Zhou X, Liu J. Physiological and molecular effects of salicylic acid on rice seed germination at low temperature[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2024, 57(7): 1220-1236. (in Chinese with English abstract)
- [13] Nguyen T N, Tuan P A, Ayele B T. Jasmonate regulates seed dormancy in wheat via modulating the balance between gibberellin and abscisic acid[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73(8): 2434-2453.
- [14] Shu K, Zhang H, Wang S, Chen M, Wu Y, Tang S, Liu C, Feng Y, Cao X, Xie Q. ABI4 regulates primary seed dormancy by regulating the biogenesis of abscisic acid and gibberellins in *Arabidopsis*[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(6): e1003577.
- [15] Sun M, Shen Y, Chen Y, Wang Y, Cai X, Yang J, Jia B, Dong W, Chen X, Sun X. *Osa*-miR1320 targets the ERF transcription factor OsERF096 to regulate cold tolerance via JA-mediated signaling[J]. *Plant Physiology*, 2022, 189(4): 2500-2516.
- [16] To A, Valon C, Savino G, Guilleminot J, Devic M, Giraudat J, Parcy F. A network of local and redundant gene regulation governs *Arabidopsis* seed maturation[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(7): 1642-1651.
- [17] Xie Z, Zhang Z L, Hanzlik S, Cook E, Shen Q J. Salicylic acid inhibits gibberellin-induced α -amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible *WRKY* gene[J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 64(3): 293-303.
- [18] Anand A, Kumari A, Thakur M, Koul A. Hydrogen peroxide signaling integrates with phytohormones during the germination of magnetoprimed tomato seeds[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 8814.

- [19] Guha T, Das H, Mukherjee A, Kundu R. Elucidating ROS signaling networks and physiological changes involved in nanoscale zero valent iron primed rice seed germination sensu stricto[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2021, 171: 11-25.
- [20] Howard T P, Fahy B, Craggs A, Mumford R, Leigh F, Howell P, Greenland A, Smith A M. Barley mutants with low rates of endosperm starch synthesis have low grain dormancy and high susceptibility to preharvest sprouting[J]. *The New Phytologist*, 2012, 194(1): 158-167.
- [21] Li W Y, Chen B X, Chen Z J, Gao Y T, Chen Z, Liu J. Reactive oxygen species generated by NADPH oxidases promote radicle protrusion and root elongation during rice seed germination[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(1): 110.
- [22] 邓本良. 活性氧调控作物种子发芽机理的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2020, 48(13): 21-22, 26.
Deng B L. Research advances of reactive oxygen species in regulating crop seed germination[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2020, 48(13): 21-22, 26. (in Chinese with English abstract)
- [23] Xiong M, Yu J, Wang J, Gao Q, Huang L, Chen C, Zhang C, Fan X, Zhao D, Liu Q Q, Li Q F. Brassinosteroids regulate rice seed germination through the BZR1-RAMY3D transcriptional module[J]. *Plant Physiology*, 2022, 189(1): 402-418.
- [24] Du L, Xu F, Fang J, Gao S, Tang J, Fang S, Wang H, Tong H, Zhang F, Chu J, Wang G, Chu C. Endosperm sugar accumulation caused by mutation of PHS8/ISA1 leads to pre-harvest sprouting in rice[J]. *The Plant Journal*, 2018, 95(3): 545-556.
- [25] Zhao J, Wang J, Liu J, Zhang P, Kudoyarova G, Liu C J, Zhang K. Spatially distributed cytokinins: Metabolism, signaling, and transport[J]. *Plant Communications*, 2024, 5(7): 100936.
- [26] Faix B, Radchuk V, Nerlich A, Hümmer C, Radchuk R, Neil Emery R J, Keller H, Götz K P, Weschke W, Geigenberger P, Weber H. Barley grains, deficient in cytosolic small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase, reveal coordinate adjustment of C: N metabolism mediated by an overlapping metabolic-hormonal control[J]. *The Plant Journal*, 2012, 69(6): 1077-1093.
- [27] Sugimoto K, Takeuchi Y, Ebana K, Miyao A, Hirochika H, Hara N, Ishiyama K, Kobayashi M, Ban Y, Hattori T, Yano M. Molecular cloning of *Sdr4*, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(13): 5792-5797.
- [28] Zhao B, Zhang H, Chen T, Ding L, Zhang L, Ding X, Zhang J, Qian Q, Xiang Y. *Sdr4* dominates pre-harvest sprouting and facilitates adaptation to local climatic condition in Asian cultivated rice[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(6): 1246-1263.
- [29] Song S, Wang G, Wu H, Fan X, Liang L, Zhao H, Li S, Hu Y, Liu H, Ayaad M, Xing Y. OsMFT2 is involved in the regulation of ABA signaling-mediated seed germination through interacting with OsbZIP23/66/72 in rice[J]. *The Plant Journal*, 2020, 103(2): 532-546.
- [30] Shen J, Zhang L, Wang H, Guo J, Li Y, Tan Y, Shu Q, Qian Q, Yu H, Chen Y, Song S. The phosphatidylethanolamine-binding proteins OsMFT1 and OsMFT2 regulate seed dormancy in rice[J]. *The Plant Cell*, 2024, 36(9): 3857-3874.
- [31] Xu F, Tang J, Wang S, Cheng X, Wang H, Ou S, Gao S, Li B, Qian Y, Gao C, Chu C. Antagonistic control of seed dormancy in rice by two bHLH transcription factors[J]. *Nature Genetics*, 2022, 54(12): 1972-1982.
- [32] Fu F F, Xue H W. Coexpression analysis identifies Rice Starch Regulator1, a rice AP2/EREBP family transcription factor, as a novel rice starch biosynthesis regulator[J]. *Plant Physiology*, 2010, 154(2): 927-938.
- [33] Gu C, Guo Z H, Hao P P, Wang G M, Jin Z M. Multiple regulatory roles of AP2/ERF transcription factor in angiosperm[J]. *Botanical Studies*, 2017, 58(1): 6.
- [34] Ma Z, Hu L, Jiang W. Understanding AP2/ERF transcription factor responses and tolerance to various abiotic stresses in plants: A comprehensive review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(2): 893.
- [35] Ma Z, Wu T, Huang K, Jin Y M, Li Z, Chen M, Yun S, Zhang H, Yang X, Chen H, Bai H, Du L, Ju S, Guo L, Bian M, Hu L, Du X. A novel AP2/ERF transcription factor, OsRPH1, negatively regulates plant height in rice[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 709.
- [36] Yaish M W, El-Kereamy A, Zhu T, Beatty P H, Good A G, Bi Y M, Rothstein S J. The APETALA-2-like transcription factor OsAP2-39 controls key interactions between abscisic acid and gibberellin in rice[J]. *PLoS Genetics*, 2010, 6(9): e1001098.
- [37] Qi W, Sun F, Wang Q, Chen M, Huang Y, Feng Y Q, Luo X, Yang J. Rice ethylene-response AP2/ERF factor OsEATB restricts internode elongation by down-regulating a gibberellin biosynthetic gene[J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(1): 216-228.
- [38] Huang K, Lu F, Chen P, Jiao G, Lin H, Zhang J, Zhao S, Cao R, Shao G, Sheng Z, Hu S, Tang S, Hu P, Wei X. A large-scale gene regulatory network for rice endosperm starch biosynthesis and its application in genetic

- improvement of rice quality[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2025, 23(7): 2583-2594.
- [39] Huijser C, Kortstee A, Pego J, Weisbeek P, Wisman E, Smeeckens S. The *Arabidopsis* *sucrose uncoupled-6* gene is identical to *ABSCISIC acid insensitive-4*: Involvement of abscisic acid in sugar responses[J]. *The Plant Journal*, 2000, 23(5): 577-585.
- [40] Wang C, Wang H, Zhang J, Chen S. A seed-specific AP2-domain transcription factor from soybean plays a certain role in regulation of seed germination[J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2008, 51(4): 336-345.
- [41] Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, León P. Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar[J]. *Genes & Development*, 2000, 14(16): 2085-2096.
- [42] Shu K, Chen Q, Wu Y, Liu R, Zhang H, Wang P, Li Y, Wang S, Tang S, Liu C, Yang W, Cao X, Serino G, Xie Q. ABI4 mediates antagonistic effects of abscisic acid and gibberellins at transcript and protein levels[J]. *The Plant Journal*, 2016, 85(3): 348-361.
- [43] Tuan P A, Kumar R, Rehal P K, Toora P K, Ayele B T. Molecular mechanisms underlying abscisic acid/gibberellin balance in the control of seed dormancy and germination in cereals[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 668.
- [44] 刘建利. 7种激素对蒺藜状苜蓿种子发芽的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2010, 28(2): 113-117.
Liu J L. Effects of 7 plant growth regulators on seed germination of *Medicago truncatula*[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2010, 28(2): 113-117. (in Chinese with English abstract)
- [45] Brady S M, Sarkar S F, Bonetta D, McCourt P. The abscisic acid insensitive 3 (ABI₃) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2003, 34(1): 67-75.
- [46] Liu P P, Montgomery T A, Fahlgren N, Kasschau K D, Nonogaki H, Carrington J C. Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages[J]. *The Plant Journal*, 2007, 52(1): 133-146.
- [47] Ramaih S, Guedira M, Paulsen G M. Relationship of indoleacetic acid and tryptophan to dormancy and preharvest sprouting of wheat[J]. *Functional Plant Biology*, 2003, 30(9): 939-945.
- [48] Liu X, Zhang H, Zhao Y, Feng Z, Li Q, Yang H Q, Luan S, Li J, He Z H. Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI₃ activation in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(38): 15485-15490.
- [49] Mallory A C, Bartel D P, Bartel B. microRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(5): 1360-1375.
- [50] Wang J W, Wang L J, Mao Y B, Cai W J, Xue H W, Chen X Y. Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(8): 2204-2216.
- [51] Chapman E J, Estelle M. Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants[J]. *Annual Review of Genetics*, 2009, 43: 265-285.
- [52] Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S. Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15(7): 1591-1604.
- [53] Kurepa J, Li Y, Smalle J A. Cytokinin signaling stabilizes the response activator ARR1[J]. *The Plant Journal*, 2014, 78(1): 157-168.
- [54] Zhao Z, Andersen S U, Ljung K, Dolezal K, Miotk A, Schultheiss S J, Lohmann J U. Hormonal control of the shoot stem-cell niche[J]. *Nature*, 2010, 465(7301): 1089-1092.
- [55] Nie L, Song S, Yin Q, Zhao T, Liu H, He A, Wang W. Enhancement in seed priming-induced starch degradation of rice seed under chilling stress via GA-mediated α -amylase expression[J]. *Rice*, 2022, 15(1): 19.
- [56] Bailly C, El-Maarouf-Bouteau H, Corbineau F. From intracellular signaling networks to cell death: The dual role of reactive oxygen species in seed physiology[J]. *Comptes Rendus Biologies*, 2008, 331(10): 806-814.
- [57] El-Maarouf-Bouteau H, Bailly C. Oxidative signaling in seed germination and dormancy[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2008, 3(3): 175-182.
- [58] Foyer C H, Noctor G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2005, 28(8): 1056-1071.
- [59] Gill S S, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48(12): 909-930.
- [60] Zavaliev R, Dong X. NPR1, a key immune regulator for plant survival under biotic and abiotic stresses[J]. *Molecular Cell*, 2024, 84(1): 131-141.
- [61] Gao W, Liu Y, Huang J, Chen Y, Chen C, Lu L, Zhao H, Men S, Zhang X. MES7 modulates seed germination via

- regulating salicylic acid content in *Arabidopsis*[J]. *Plants*, 2021, 10(5): 903.
- [62] Wani A B, Chadar H, Wani A H, Singh S, Upadhyay N. Salicylic acid to decrease plant stress[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2017, 15(1): 101-123.
- [63] Mishra P, Dubey R S. Effect of aluminium on metabolism of starch and sugars in growing rice seedlings[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2008, 30(3): 265-275.
- [64] Gómez-Cadenas A, Zentella R, Walker-Simmons M K, Ho T H. Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: Site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules[J]. *The Plant Cell*, 2001, 13(3): 667-679.
- [65] Wang E, Xu X, Zhang L, Zhang H, Lin L, Wang Q, Li Q, Ge S, Lu B R, Wang W, He Z. Duplication and independent selection of cell-wall invertase genes GIF1 and OsCIN1 during rice evolution and domestication[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10: 108.
- [66] He Y, Zhu M, Li Z, Jiang S, He Z, Xu S, Chen X, Hu Z, Zhang Z. IPA1 negatively regulates early rice seedling development by interfering with starch metabolism via the GA and WRKY pathways[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(12): 6605.
- [67] Ishibashi Y, Kasa S, Sakamoto M, Aoki N, Kai K, Yuasa T, Hanada A, Yamaguchi S, Iwaya-Inoue M. A role for reactive oxygen species produced by NADPH oxidases in the embryo and aleurone cells in barley seed germination[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143173.