

老化处理对大豆种子活力及线粒体抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响

田茜, 王栋, 张文兰, 段乃彬, 李群, 颜廷进, 戴双, 丁汉凤*

山东省农作物种质资源中心, 济南250100

摘要: 以大豆‘中黄13’为材料, 研究人工老化后大豆种子活力及线粒体抗坏血酸-谷胱甘肽(ASC-GSH)循环的变化。结果表明, 随老化时间的延长, 大豆种子的发芽率、发芽势、发芽指数和活力指数均显著下降; 老化种子的相对电导率和丙二醛(MDA)含量随着老化时间的延长逐渐增大, 超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)产生速率和过氧化氢(H_2O_2)含量呈现先升高后降低的趋势; 与对照相比, 老化种子中线粒体细胞色素c氧化酶(COX)和苹果酸脱氢酶(MDH)活性显著下降, 呼吸速率和呼吸控制率(RCR)显著降低; 老化种子中线粒体超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)和谷胱甘肽还原酶(GR)的活性以及总ASC和GSH含量显著降低, 说明老化导致活性氧(ROS)代谢异常, 线粒体呼吸功能及ASC-GSH循环紊乱。ROS的过量积累可能是导致种子活力丧失的主要原因。

关键词: 大豆; 人工老化; 线粒体; 活性氧; 抗坏血酸-谷胱甘肽循环

低温、低含水量是抑制种子老化的常用方法, 低温库是保存种质资源的理想场所(Lu等2005)。然而, 许多研究表明, 即使在低温种质库中保存, 种子仍然会缓慢衰老, 遭受一系列生化裂变, 包括膜透性增加、酶活性降低、贮藏物质减少等(McDonald 1999; Walters等2005; Bellani等2012)。种子老化不仅影响种子萌发, 也会降低种子的质量和品质, 对农业生产造成巨大的经济损失。在研究种子老化机制时, 通常采用人工老化模拟种子老化, 判断种子活力(Goel等2003)。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累是导致种子老化的主要原因之一(Møller 2001), 细胞中ROS的过量积累能够导致脂质过氧化、抗氧化酶活性降低、蛋白质和RNA的合成受阻以及DNA的降解(McDonald 1999; Chen等2013), 最终导致种子活力的丧失, 这已在大豆(Sung 1996)、棉花(Goel等2003)、向日葵(Kibinza等2006)、豌豆(Yao等2012)和燕麦(Xia等2015)等种子的老化研究中证实。

线粒体是种子萌发过程中产生和清除ROS的主要细胞器(Møller 2001; Navrot等2007), 同时线粒体又是进行氧化磷酸化和产生ATP的主要场所, 为细胞的生物合成提供能量和中间物质(Macherel等2007; Taylor等2010; Carrie等2013)。线粒体不仅是内源ROS的主要来源, 也是ROS攻击的首要目标, 过量的ROS能够导致线粒体蛋白质、脂类和核酸的氧化损伤(Bartoli等2004)。同时, 线粒体中也存在着多条抗氧化途径, 包括酶促抗氧化系统和非酶促抗氧化系统, 线粒体抗氧化系统对于线粒体ROS的清除和减少线粒体氧化损伤具有重要作用

(Navrot等2007)。Jimenez等(1997)最早证明了豌豆叶片的线粒体中存在完整的抗坏血酸-谷胱甘肽(ASC-GSH)循环, 并且ASC-GSH循环在ROS的清除中发挥重要作用。从此线粒体ASC-GSH循环成为植物逆境研究的难点和热点。目前, 有关线粒体ASC-GSH循环的研究已在豌豆(Jiménez等1997)、番茄(Mittova等2004)、黄瓜(Song等2009)、玉米(Wu等2009)、马铃薯(王芳等2014)、大豆(Xin等2014)和花生(Zhan等2014)等植物中普遍开展。然而, 人工老化对种子线粒体ASC-GSH循环影响的报道还不多。

本文以大豆品种‘中黄13’为实验材料, 通过研究人工老化对种子活力、细胞ROS积累、脂质过氧化、线粒体呼吸速率、抗氧化酶活性以及抗氧化剂含量的影响, 探讨线粒体在种子老化和ROS代谢中的作用机理, 为从亚细胞水平揭示种子的衰老机理提供参考。

材料与amp;方法

1 材料与处理

实验材料为大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]品种‘中黄13’, 种子初始发芽率为98%, 初始含水量为

收稿 2015-12-22 修订 2016-02-28

资助 山东省现代农业产业技术体系杂粮产业创新团队建设(SDARS-15-01)、公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303007)、“十二五”国家科技支撑计划课题(2013BAD01B0106)和山东省农业科学院青年科研基金(2016YQN19)。

* 通讯作者(E-mail: dinghf2005@163.com)。

12.5%。将大豆种子密封于铝箔袋中,置于40°C人工老化箱中分别老化0、14、21和42 d,然后将种子置于-20°C冰箱内保存。

2 发芽指标的测定

种子发芽试验参照国际种子检验协会(1996)进行,随机选取100粒种子置于发芽床,4次重复,在25°C恒温培养箱中培养7 d,逐日检查发芽种子数。各指标按以下公式计算:

$$\text{发芽势}(\%) = \frac{\text{第3天发芽数}}{\text{种子总数}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{发芽率}(\%) = \frac{\text{第7天发芽数}}{\text{种子总数}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{发芽指数}(\text{GI}) = \sum(G_i/D_i) \quad (3)$$

$$\text{活力指数}(\text{VI}) = \text{GI} \times \text{DW} \quad (4)$$

式中, G_i 为第 t 天发芽数, D_i 为相应发芽天数, DW 为幼苗干重。

3 电导率、丙二醛(MDA)及ROS含量测定

选取10粒完整的种子用去离子水冲洗3次,用滤纸吸干种子表面水分,加入25 mL去离子水,25°C保温24 h。用Mettler-Toledo Delta 326电导率仪测定浸出液电导率(a_1),然后将种子及其浸出液置于100°C水浴中煮沸15 min,取出冷却至25°C,测定煮沸后种子浸出液电导率(a_2)。计算出浸出液的相对电导率。

$$\text{相对电导率}(\%) = a_1/a_2 \times 100\% \quad (5)$$

吸胀24 h大豆胚轴中MDA含量的测定参照王爱国等(1986)的方法,即硫代巴比妥酸(TBA)比色法;吸胀24 h大豆胚轴中超氧阴离子(O_2^-)产生速率的测定参照王爱国等(1990)的方法;过氧化氢(H_2O_2)含量的测定参照林植芳等(1988)的方法。

4 线粒体提取及生理生化指标测定

4.1 线粒体提取

参照Yin等(2009)的方法进行大豆胚轴线粒体的提取。取150粒吸胀24 h的大豆胚轴加入30 mL预冷的研磨液[50 mmol·L⁻¹磷酸钾缓冲液(pH 8.0)、0.3 mol·L⁻¹蔗糖、0.5% (m/V)牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、0.5% (m/V)聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone-40, PVP-40)、2.0 mmol·L⁻¹乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)和20 mmol·L⁻¹半胱氨酸]。匀浆液经4层纱布过滤后于2 000×g离心15 min,所得上清于12 000×g离心15 min,沉淀用30 mL洗涤介质[0.3 mol·L⁻¹蔗糖、1.0 mmol·L⁻¹ EDTA和50 mmol·L⁻¹

KOH, pH 7.2]悬浮,经12 000×g离心15 min,收集沉淀再用上述介质洗涤1次,沉淀即为粗制线粒体,并悬浮于少量洗涤介质中。然后将粗制线粒体悬浮液铺在不连续Percoll梯度上, Percoll溶液浓度自下而上为21% (m/V)和40% (m/V), Percoll溶液由上述洗涤介质配制,二者比例为1:1, 40 000×g离心1 h。收集21%和40% Percoll界面间的线粒体,用洗涤介质[0.3 mol·L⁻¹蔗糖、0.5% (m/V) BSA和10 mmol·L⁻¹三乙氧基硅烷(triethoxysilane, TES; pH 7.5)]洗涤3次(最后一次不含BSA), 18 000×g离心15 min,沉淀即为纯化的线粒体,悬浮于少量洗涤介质中(不含BSA)。所有的操作步骤都在0~4°C下进行。

4.2 线粒体呼吸活性的测定

用氧电极(Chlorolab 2, Hansatech, UK)在25°C下测定线粒体耗氧量(Yin等2009)。取约100 μg线粒体蛋白加入总体积为1 mL的反应介质[0.3 mol·L⁻¹蔗糖、10 mmol·L⁻¹ TES-KOH (pH 7.5)、5 mmol·L⁻¹ KH_2PO_4 、10 mmol·L⁻¹ NaCl、2 mmol·L⁻¹ MgSO_4 以及0.1% (m/V) BSA]中。以还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(reduced form of nicotinamide-adenine dinucleotide, NADH)、琥珀酸和ADP为呼吸底物和辅助因子,终浓度为10 mmol·L⁻¹琥珀酸、1 mmol·L⁻¹ NADH和0.8 mmol·L⁻¹ ADP。呼吸控制率(respiratory control ratio, RCR)为加入ADP后的呼吸(即III态呼吸)速率与ADP耗尽后的呼吸(即IV态呼吸)速率之比。

线粒体中细胞色素c氧化酶(cytochrome c oxidase, COX)活性测定参考Neuburger等(1985)的方法,通过测定由于还原性细胞色素c的氧化导致的550 nm处吸光值的降低,得出COX的活性。苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH)活性的测定参考Glatthaar等(1974)的方法,利用紫外分光光度计在340 nm处吸光值的增加来表示MDH的活性。

4.3 线粒体抗氧化酶活性测定

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)、脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)、单脱氢抗坏血酸还原酶(monodehydroascorbate reductase, MDHAR)和谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)活性的测定参照Mittova等(2004)的方法。

4.4 线粒体抗氧化剂含量测定

用5%磺基水杨酸提取抗氧化剂。取纯化后的线粒体加入预冷的5%磺基水杨酸, 漩涡震荡20 min, 然后4°C、20 000×g离心20 min, 取上清分装后保存于-80°C或直接进行抗氧化剂含量测定。还原型抗坏血酸(ascorbate, reduced form; ASC)和氧化型抗坏血酸(ascorbate, oxidized form; DHA)含量的测定参照Law等(1983)的方法, 还原型谷胱甘肽(glutathione, reduced form; GSH)以及氧化型谷胱甘肽(glutathione, oxidized form; GSSG)含量的测定参照Griffith (1980)的方法。

测定上述指标时以线粒体蛋白(mg)表示线粒体量, 用Bradford(1976)的方法测定蛋白含量。

5 数据分析

各项指标测定均设置3次重复, 结果取平均值。试验数据采用Excel 2007和SPSS 17.0软件进行数据统计与显著性分析。

实验结果

1 人工老化对种子发芽特性的影响

表1显示, 经40°C密封老化后, 大豆种子的发

芽率、发芽势、发芽指数和活力指数均呈下降趋势, 且与对照相比呈显著差异。与对照相比, 人工老化14、21和42 d后发芽率分别降为84%、50%和0%。人工老化14 d后, 与对照相比, 种子的发芽率、发芽势、发芽指数和活力指数分别下降了14%、26%、31%和82%, 以活力指数下降最为明显, 说明老化过程中, 种子活力先于生活力下降, 活力指数对老化处理更为敏感。由此可见, 人工老化显著抑制了大豆种子的萌发, 降低了种子的活力。

2 人工老化对ROS积累及脂质过氧化水平的影响

由图1可知, 老化种子的相对电导率和MDA含量均高于对照, 且随着老化时间的延长逐渐增大。老化14、21和42 d后, 相对电导率分别是对照的2.3、4.0和5.9倍; 老化14 d后, MDA含量增加不显著, 老化21和42 d后比对照分别增加了72.4%和109.6%, 差异显著。结果表明人工老化加剧了细胞膜脂质过氧化作用, 导致细胞膜的完整性遭到破坏, 渗透性增加。

如图2所示, 人工老化过程中, O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量的变化趋势一致, 表现出先升高后降低

表1 人工老化对大豆种子发芽指标的影响

Table 1 Effect of artificial aging on germination characteristics of soybean seeds

老化时间/d	发芽率/%	发芽势/%	发芽指数	活力指数
0	98.00±2.31 ^a	96.00±3.27 ^a	39.83±3.57 ^a	157.01±25.37 ^a
14	84.00±7.83 ^b	71.00±8.72 ^b	27.58±1.89 ^b	28.25±5.43 ^b
21	50.00±6.93 ^c	31.00±6.00 ^c	15.42±2.47 ^c	9.50±3.21 ^c
42	0 ^d	0 ^d	0 ^d	0 ^d

同一列数据用不同小写字母标识表示差异显著($P<0.05$), 表2~4同。

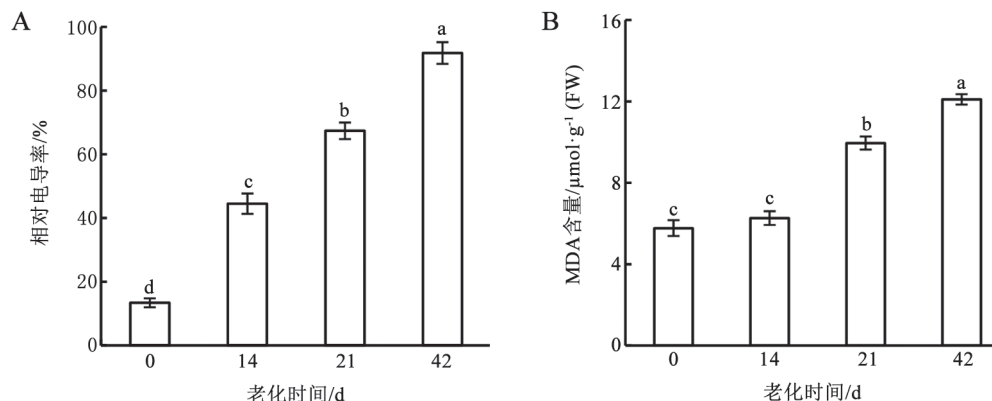


图1 人工老化对大豆种子相对电导率和胚轴MDA含量的影响

Fig.1 Effect of artificial aging on the relative conductances of soybean seeds and MDA contents in embryonic axes of soybean seeds

单个图各柱形上用不同小写字母标识表示数据间差异显著($P<0.05$), 图2和3同。

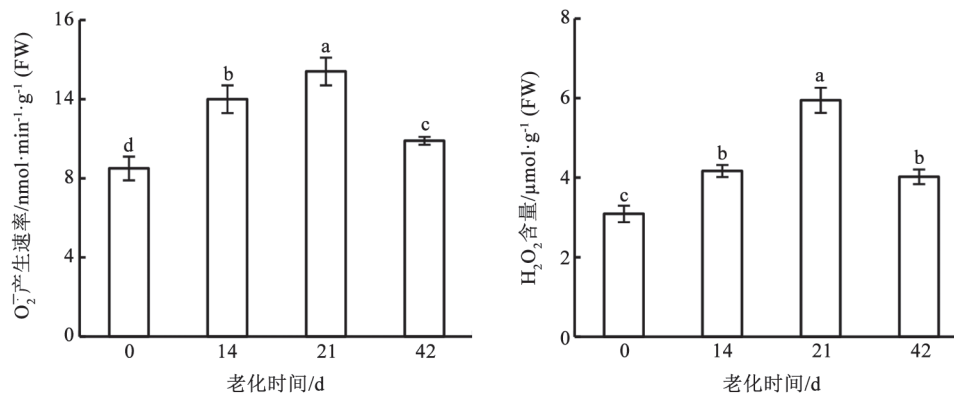


图2 人工老化对大豆种子胚轴O₂⁻产生速率和H₂O₂含量的影响

Fig.2 Effect of artificial aging on the generating rates of O₂⁻ and the contents of H₂O₂ in embryonic axes of soybean seeds

的趋势, 在老化21 d时达到高峰, 分别高出对照57.2%和92.5%, 差异显著。老化42 d时, O₂⁻产生速率和H₂O₂含量显著下降, 但仍显著高于对照水平。结果说明在种子老化初期, ROS大量产生并积累, 到老化后期ROS产生减少, 推测是由于老化42 d种子中线粒体活性显著下降, 导致ROS产生也随之减少。

3 人工老化对线粒体活性的影响

为了研究人工老化对线粒体功能, 例如TCA、电子传递链的影响, 测定了线粒体中COX、MDH的活性和呼吸速率。线粒体COX活性和MDH活性随老化时间的延长而呈迅速下降趋势, 且与对照差异显著(图3)。与对照相比, 老化42 d后, 线粒体COX活性和MDH活性分别下降了73.4%和75.4%。

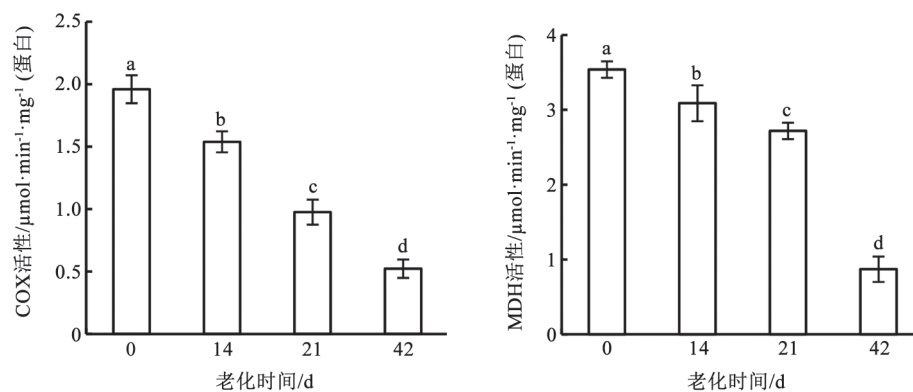


图3 人工老化对大豆种子胚轴线粒体COX和MDH活性的影响

Fig.3 Effect of artificial aging on the activities of mitochondrial COX and MDH in embryonic axes of soybean seeds

表明随着老化时间的延长, 线粒体三羧酸循环受阻, 呼吸系统损伤将导致电子传递链电子漏增加, 增加ROS产生。

线粒体呼吸速率和RCR的测定反映了以NADH和琥珀酸为底物的耗氧量及氧化磷酸化偶联程度。由表2可知, 线粒体呼吸速率对老化极为敏感, 在老化14 d时, 与对照相比, 以NADH和琥珀酸为底物的呼吸速率分别下降了52.8%和45.5%,

RCR分别下降了22.7%和16.1%。老化42 d后, 以NADH和琥珀酸为底物的呼吸速率比对照降低了93.6%和90.1%, RCR降低了44.7%和37.0%。由此可见, 老化种子萌发过程中线粒体功能紊乱, 呼吸速率下降, 老化抑制了线粒体的电子传递链和氧化磷酸化偶联效率。

4 人工老化对线粒体抗氧化系统的影响

表3表明, 人工老化处理后, 种胚线粒体

表2 人工老化对大豆胚轴线粒体呼吸速率和RCR的影响

Table 2 Effect of artificial aging on the respiration rate and RCR of mitochondria in embryonic axes of soybean seeds

老化时间/d	NADH			琥珀酸		
	III态呼吸速率/nmol (O ₂)·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ (蛋白)	IV态呼吸速率/nmol (O ₂)·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ (蛋白)	RCR	III态呼吸速率/nmol (O ₂)·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ (蛋白)	IV态呼吸速率/nmol (O ₂)·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ (蛋白)	RCR
0	215.53±17.73 ^a	103.73±10.77 ^a	2.09±0.22 ^a	119.28±13.22 ^a	69.73±4.45 ^a	1.71±0.14 ^a
14	102.17±6.61 ^b	63.47±4.48 ^b	1.62±0.15 ^b	65.00±7.55 ^b	45.43±6.12 ^b	1.44±0.08 ^b
21	57.60±4.37 ^c	38.57±5.82 ^c	1.51±0.14 ^b	50.14±2.74 ^c	37.20±1.65 ^c	1.35±0.09 ^c
42	14.04±4.71 ^d	12.00±2.99 ^d	1.15±0.10 ^c	11.00±2.6 ^d	10.17±2.03 ^d	1.08±0.05 ^d

表3 人工老化对大豆胚轴线粒体抗氧化酶活性的影响

Table 3 Effect of artificial aging on the activities of mitochondrial antioxidant enzymes in embryonic axes of soybean seeds

老化时间/d	SOD活性/ U·mg ⁻¹ (蛋白)	APX活性/ μ mol (ASA)·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ (蛋白)	MDHAR活性/ μ mol (NADH)·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ (蛋白)	DHAR活性/ μ mol (ASA)·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ (蛋白)	GR活性/ μ mol (NADPH)·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ (蛋白)
	0	44.96±1.50 ^a	0.164±0.033 ^a	0.130±0.006 ^a	0.51±0.09 ^a
14	37.42±1.46 ^b	0.087±0.013 ^b	0.097±0.005 ^b	0.49±0.06 ^a	0.046±0.001 ^b
21	26.01±2.16 ^c	0.066±0.006 ^c	0.036±0.001 ^c	0.37±0.05 ^b	0.039±0.025 ^c
42	5.88±1.70 ^d	0.030±0.006 ^d	0.018±0.004 ^d	0.31±0.04 ^b	0.024±0.002 ^d

SOD、APX、MDHAR、DHAR和GR的活性呈现逐渐降低的趋势,并且SOD、APX、MDHAR和GR的活性在老化14 d时就显著低于对照水平。老化42 d时,线粒体中SOD、APX、MDHAR、DHAR和GR的活性分别高于对照86.9%、81.5%、86.2%、38.4%和59.7%,表明老化降低了线粒体抗氧化酶的活性,使其ROS清除能力受到影响。

由表4可见,随着老化处理时间的延长,种胚线粒体中ASC和GSH的含量逐渐降低,且各处理与对照差异显著。DHA含量在老化14 d后高于对照,是对照的1.4倍,老化14、21和42 d间差异不显著;GSSG含量在老化14 d后显著低于对照,是对照的67.4%,老化14、21和42 d间差异不显著。老化种子的ASC/DHA和GSH/GSSG比值也显著低于对照,说明老化种子中抗氧化物质合成及再生能力下降。

表4 人工老化对大豆胚轴线粒体抗氧化剂含量的影响

Table 4 Effect of artificial aging on the contents of mitochondrial antioxidants in embryonic axes of soybean seeds

老化时间/d	ASC含量/ nmol·mg ⁻¹ (蛋白)	DHA含量/ nmol·mg ⁻¹ (蛋白)	ASC/DHA比值	GSH含量/ nmol·mg ⁻¹ (蛋白)	GSSG含量/ nmol·mg ⁻¹ (蛋白)	GSH/GSSG比值
0	6.06±0.27 ^a	1.05±0.11 ^a	6.47±0.39 ^a	0.67±0.12 ^a	0.52±0.08 ^a	1.04±0.13 ^a
14	5.54±0.20 ^b	1.42±0.24 ^{ab}	4.28±0.26 ^b	0.19±0.03 ^b	0.20±0.02 ^b	0.93±0.22 ^a
21	4.79±0.22 ^c	1.48±0.10 ^b	3.24±0.34 ^c	0.11±0.01 ^c	0.23±0.04 ^b	0.49±0.06 ^b
42	4.03±0.14 ^d	1.51±0.10 ^c	2.69±0.27 ^c	0.05±0.01 ^d	0.25±0.02 ^b	0.19±0.06 ^c

讨 论

种子老化是种子贮藏过程中影响种子质量和活力的主要因素。在种子贮藏过程中,保持较高水平的种子质量和活力至关重要(Deepa等2013)。在本研究中,大豆种子经40℃老化后,种子的发芽率、发芽势、发芽指数和活力指数均显著下降,说明老化降低了种子的活力。MDA是膜脂过氧化

的主要产物之一,其含量高低是衡量老化过程中膜脂过氧化程度的重要指标(Willson和McDonald 1986)。种子活力的降低伴随着电导率和MDA含量的显著升高,说明人工老化影响了种子萌发过程中细胞膜的完整性。我们的结果也证明了老化导致ROS含量的积累,这表明种子萌发过程中ROS的积累启动了膜脂过氧化,破坏了细胞膜的完整

性,使电解质大量外渗,从而导致种子活力的丧失,这也进一步证明ROS的积累是导致种子老化的主要原因之一(McDonald 1999; Goel等2003)。

MDH和COX是和呼吸作用相关的线粒体标志酶(潘瑞焱2004)。本研究中,种子老化过程中,MDH和COX酶活性的逐渐降低,说明老化影响了线粒体电子传递和TCA循环,呼吸底物的供给受到限制(Song等2001)。呼吸酶活性的降低可能是由于被氧化胁迫条件下产生的NO所抑制(Macherel等2007),另一方面可能是由于被过量ROS攻击,发生了蛋白质氧化损伤。大豆种子萌发过程中,胚轴不含有叶绿体,线粒体ATP是主要的能量来源。本研究结果表明,老化种子线粒体的呼吸速率和RCR显著低于对照,这与对大豆(Amable和Obendorf 1986)、甘蓝(Betty等1996)和豌豆(Benamar等2003)的研究结果一致,说明人工老化严重抑制了线粒体膜的电子传递能力和氧化磷酸化耦联作用,其利用氧化释放能量转化ATP的效率明显降低(Xin等2014; Yin等2009),这可能是由于老化导致电子传递障碍,使ROS大量积累,过量的 O_2^- 和 H_2O_2 攻击线粒体膜系统,启动膜脂质过氧化,使线粒体膜的完整性降低,呼吸酶活性降低,最终导致线粒体氧化损伤,呼吸功能遭到破坏,使老化种子萌发过程中ATP供应不足。

SOD和ASC-GSH循环在线粒体ROS的清除和减少线粒体损伤中发挥重要作用。总的来说,我们的结果表明随着老化时间的延长,SOD、APX、MDHAR、DHAR和GR的活性降低,ASC含量、ASC/DHA比值以及GSH含量、GSH/GSSG比值均下降,说明SOD和ASC-GSH循环清除ROS能力降低,ROS的产生与清除失去平衡,导致细胞中ROS的积累,引发氧化胁迫,引起线粒体蛋白质、脂类和DNA氧化损伤,使线粒体功能受损(Mittova等2004; Xin等2014)。SOD是抗氧化系统的第一道方向,它可以把 O_2^- 歧化成 H_2O_2 。del Río等(2003)研究发现衰老降低了线粒体Mn-SOD转录水平,这可能是导致SOD活性降低的原因之一。ASC-GSH循环中,APX、MDHAR和GR活性随着老化时间的延长持续降低,而DHAR活性降低缓慢,说明DHAR是清除 H_2O_2 以及ASC再生的主要酶,这与Jiménez等(1997)的结果相一致。

总之,我们的结果表明人工老化降低了线粒体的呼吸功能和ASC-GSH循环的抗氧化能力,使细胞中ROS和MDA含量升高,ROS的积累进一步导致线粒体发生氧化损伤,电子传递和氧化磷酸化产生ATP的效率降低,导致种子萌发过程中线粒体不能提供足够的ATP和中间物质。

参考文献

- Amable RA, Obendorf RL (1986). Soybean seed respiration during simulated preharvest deterioration. *J Exp Bot*, 37 (182): 1364–1375
- Bartoli CG, Gómez F, Martínez DE, Guaiamet JJ (2004). Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Exp Bot*, 55 (403): 1663–1669
- Bellani LM, Salvini L, Dell'Aquila A, Scialabba A (2012). Reactive oxygen species release, vitamin E, fatty acid and phytosterol contents of artificially aged radish (*Raphanus sativus* L.) seeds during germination. *Acta Physiol Plant*, 34: 1789–1799
- Benamar A, Tallon C, Macherel D (2003). Membrane integrity and oxidative properties of mitochondria isolated from imbibing pea seeds after priming or accelerated ageing. *Seed Sci Res*, 13: 35–45
- Betty M, Finch-Savage WE (1996). Respiratory enzyme activities during germination in *Brassica* seed lots of differing vigor. *Seed Sci Res*, 6: 165–173
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248–254
- Carrie C, Murcha MW, Giraud E, Ng S, Zhang MF, Narsai R, Whelan J (2013). How do plants make mitochondria? *Planta*, 237: 429–39
- Chen H, Osuna D, Colville L, Lorenzo O, Graeber K, Küster H, Leubner-Metzger G, Kranner I (2013). Transcriptome-wide mapping of pea seed ageing reveals a pivotal role for genes related to oxidative stress and programmed cell death. *PLoS ONE*, 8 (10): e78471
- Deepa GT, Chetti MB, Khetagoudar MC, Adavirao GM (2013). Influence of vacuum packaging on seed quality and mineral contents in chilli (*Capsicum annuum* L.). *J Food Sci Technol*, 50 (1): 153–158
- del Río LA, Sandalio LM, Altomare DA, Zilinskas BA (2003). Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *J Exp Bot*, 54 (384): 923–933
- Glatthaar BE, Barbarash GR, Noyes BE, Banaszak LJ, Bradshaw RA (1974). The preparation of the cytoplasmic and mitochondrial forms of malate dehydrogenase and aspartate aminotransferase from pig heart by a single procedure. *Anal Biochem*, 57 (2): 432–451
- Goel A, Goel AK, Sheoran IS (2003). Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. *J Plant Physiol*, 160: 1093–1100

- Griffith OW (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem*, 106: 207–212
- ISTA (1996). International Rules for Seed Testing. Beijing: China Agriculture Press, 187–188 (in Chinese) [国际种子检验协会 (1996). 国际种子检验规程. 北京: 中国农业出版社, 187–188]
- Jiménez A, Hernández JA, del Río LA, Sevilla F (1997). Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol*, 114: 275–284
- Kibinza S, Vinel D, Côme D, Bailly C, Corbineau F (2006). Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. *Physiol Plantarum*, 128: 496–506
- Law MY, Charles SA, Halliwell B (1983). Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat. *Biochem J*, 210: 899–903
- Lin ZF, Li SS, Lin GZ, Guo JY (1988). The accumulation of hydrogen peroxide in senescing leaves and chloroplasts in relation to lipid peroxidation. *Acta Phytophysiol Sin*, 14 (1): 16–22 (in Chinese with English abstract) [林植芳, 李双顺, 林桂珠, 郭俊彦(1988). 衰老叶片和叶绿体中H₂O₂的积累与脂质过氧化的关系. *植物生理学报*, 14 (1): 16–22]
- Lu XX, Chen XL, Guo YH (2005). Seed germinability of 23 crop species after a decade of storage in the National Genebank of China. *Agr Sci China*, 4 (6): 408–412
- Macherel D, Benamar A, Avelange-Macherel MH, Tolleter D (2007). Function and stress tolerance of seed mitochondria. *Physiol Plantarum*, 129: 233–241
- McDonald MB (1999). Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Sci Technol*, 27 (1): 177–237
- Mittova V, Guy M, Tal M, Volokita M (2004). Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *J Exp Bot*, 55 (399): 1105–1113
- Møller IM (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52 (1): 561–591
- Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP (2007). Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol Plantarum*, 129: 185–195
- Neuberger M (1985). Preparation of plant mitochondria, criteria for assessment of mitochondrial integrity and purity, survival *in vitro*. In: Douce R, Day DA (eds). *Higher Plant Cell Respiration*. Berlin: Springer-Verlag, 7–24
- Pan R (2004). *Plant Physiology*. 5th edn. Beijing: Higher Education Press (in Chinese) [潘瑞焱(2004). *植物生理学*(第5版). 北京: 高等教育出版社]
- Song SQ, Fredlund KM, Möller IM (2001). Changes in low-molecular weight heat shock protein 22 of mitochondria during high-temperature accelerated ageing of *Beta vulgaris* L. seeds. *Acta Phytophysiol Sin*, 27 (1): 73–80
- Song XS, Wang YJ, Mao WH, Shi K, Zhou YH, Nogués S, Yu JQ (2009). Effect of cucumber mosaic virus infection on electron transport and antioxidant system in chloroplasts and mitochondria of cucumber and tomato leaves. *Physiol Plantarum*, 135: 246–257
- Sung JM (1996). Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in soybean seeds during aging. *Physiol Plantarum*, 97: 85–89
- Taylor NL, Howell KA, Heazlewood JL, Tan TYW, Narsai R, Huang S, Whelan J, Millar AH (2010). Analysis of the rice mitochondrial carrier family reveals anaerobic accumulation of a basic amino acid carrier involved in arginine metabolism during seed germination. *Plant Physiol*, 154: 691–704
- Walters C, Wheeler LM, Grotenhuis JM (2005). Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Sci Res*, 15 (1): 1–20
- Wang AG, Luo GH (1990). Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants. *Plant Physiol Commun*, (6): 55–57 (in Chinese) [王爱国, 罗广华 (1990). 植物的超氧自由基与羟胺反应的定量关系. *植物生理学通讯*, (6): 55–57]
- Wang AG, Shao CB, Luo GH (1986). Inquiry into malondialdehyde as index of peroxidation of plant lipids. *Plant Physiol Commun*, (2): 55–57 (in Chinese) [王爱国, 邵从本, 罗广华(1986). 丙二醛作为植物脂质过氧化指标的探讨. *植物生理学通讯*, (2): 55–57]
- Wang F, Sun ZP, Liu YL (2014). Effects of anoxia and post-anoxia on reactive oxygen species (ROS) and antioxidant enzymes in tuber mitochondria of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Physiol J*, 50 (3): 283–289 (in Chinese with English abstract) [王芳, 孙周平, 刘义玲(2014). 缺氧及氧恢复对马铃薯块茎线粒体中活性氧及抗氧化酶的影响. *植物生理学报*, 50 (3): 283–289]
- Willson DO Jr, McDonald MB Jr (1986). The lipid peroxidation model of seed ageing. *Seed Sci Technol*, 14 (2): 269–300
- Wu JH, Wang WQ, Song SQ, Cheng HY (2009). Reactive oxygen species scavenging enzymes and down-adjustment of metabolism level in mitochondria associated with desiccation-tolerance acquisition of maize embryo. *J Integr Plant Biol*, 51 (7): 638–645
- Xia F, Chen L, Sun Y, Mao P (2015). Relationships between ultrastructure of embryo cells and biochemical variations during ageing of oat (*Avena sativa* L.) seeds with different moisture content. *Acta Physiol Plant*, 37 (4): 1–11
- Xin X, Tian Q, Yin G, Chen X, Zhang J, Ng S, Lu X (2014). Reduced mitochondrial and ascorbate–glutathione activity after artificial ageing in soybean seed. *J Plant Physiol*, 171 (2): 140–147
- Yao Z, Liu L, Gao F, Rampitsch C, Reinecke DM, Ozga JA, Ayele BT (2012). Developmental and seed aging mediated regulation of antioxidative genes and differential expression of proteins during pre- and post-germinative phases in pea. *J Plant Physiol*, 169 (15): 1477–88
- Yin G, Sun H, Xin X, Qin G, Liang Z, Jing X (2009). Mitochondrial damage in soybean seed axis during imbibition at chilling temperatures. *Plant Cell Physiol*, 50 (7): 1305–1318
- Zhan J, Li W, He HY, Li CZ, He LF (2014). Mitochondrial alterations during Al-induced PCD in peanut root tips. *Plant Physiol Biochem*, 75: 105–113

Effect of artificial aging on soybean seed vigor and ascorbate-glutathione cycle in mitochondria

TIAN Qian, WANG Dong, ZHANG Wen-Lan, DUAN Nai-Bin, LI Qun, YAN Ting-Jin, DAI Shuang, DING Han-Feng*

Shandong Center of Crop Germplasm Resources, Jinan 250100, China

Abstract: Using soybean seed (*Glycine max* L. cv. Zhonghuang No. 13) as material, changes in soybean seed vigor and mitochondrial ascorbate-glutathione (ASC-GSH) cycle after artificial aging were investigated. The results show that with the increase of aging time, the germination rate, germination potential, germination and vigor indices of soybean seeds were decreased significantly. Moreover, with prolonged aging, the relative electric conductivity and the contents of malondialdehyde (MDA) in aged seeds increased gradually, and the generating rate of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) and the contents of hydrogen peroxide (H_2O_2) presented the trend of first increased and then decreased. In comparison with the control, the cytochrome c oxidase (COX) and malate dehydrogenase (MDH) activities, respiratory rate and respiratory control ratio (RCR) of mitochondria in aged seeds were remarkably decreased. Furthermore, the activities of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), dehydroascorbate reductase (DHAR) and glutathione reductase (GR), and the total ascorbic acid (ASC) and glutathione (GSH) contents in mitochondria were reduced dramatically in aged seeds. These results indicate that reactive oxygen species (ROS) metabolism, mitochondrial respiratory function and ASC-GSH cycle were disordered in aged seeds, suggesting that the accumulation of ROS may be the key factor in the loss of seed vigor.

Key words: soybean; artificial aging; mitochondria; reactive oxygen species; ascorbate-glutathione cycle

Received 2015-12-22 Accepted 2016-02-28

This work was supported by the Grain Industry Innovation Team Building of Modern Agricultural Industry Technology System of Shandong Province (Grant No. SDARS-15-01), Public Sector (Agriculture) Special Fund Project of Scientific Research (Grant No. 201303007), "Twelfth Five-Year" National Science and Technology Support Plan (Grant No. 2013BAD01B0106), and Youth Scientific Research Fund Project of Shandong Academy of Agriculture Sciences (Grant No. 2016YQN19).

*Corresponding author (E-mail: dinghf2005@163.com).