于文波,崔彤,邢艺凡,等.高粱种子耐盐萌发的最佳引发水势及生理效应[J].山西农业大学学报(自然科学版),2024,44(3):49-58.
Yu W B, Cui T, Xing Y F,et al.Optimal osmotic potential for salt tolerance germination of sorghum seeds and its physiological effects[J].Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2024,44(3):49-58.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202312038

高粱种子耐盐萌发的最佳引发水势及生理效应

于文波[1],崔彤[1],邢艺凡[1],薄宇珊[1],陈小飞[1,2],刘畅[1],史晓龙[1],刘春娟[1],周宇飞[1*]

(1.沈阳农业大学 农学院,辽宁 沈阳 110866;2.安徽省农业科学院 作物所,安徽 合肥 230001)

摘　要:[目的]盐胁迫是抑制高粱种子萌发的重要非生物胁迫因子之一,种子引发可以有效促进高粱种子在盐胁迫下的萌发,然而种子引发的最佳水势条件及其对萌发期生理调节的效应却少有研究。[方法]本试验以PEG-6000模拟不同的引发水势,在25 ℃下配置0(P1)、-0.3(P2)、-0.6(P3)、-0.9(P4)和-1.2 MPa(P5)共5个水势梯度,研究盐胁迫下(200 mmol•L^{-1} NaCl)引发高粱种子的萌发特征,采用主成分分析法鉴选最优种子引发水势条件,并探究其生理调控作用。[结果]盐胁迫下,P3引发的高粱种子发芽势、发芽指数、活力指数及根长、胚芽长、根干重、根鲜重、胚芽干重、胚芽鲜重均高于其它处理,且主成分分析综合因子得分最高,为最佳引发水势条件。与未引发种子相比,P3引发的高粱种子胚芽内相对含水量显著提升,相对电导率呈下降趋势,胚芽内K^+/Na^+和Ca^{2+}/Na^+显著上升($P<0.05$)。同时,P3引发维持了盐胁迫下高粱种子萌发过程中线粒体结构的相对完整性,且线粒体内抗氧化酶超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性均有显著升高,表明P3引发增强了盐胁迫下胚芽内线粒体的抗氧化能力。[结论]-0.6 Mpa(P3)是盐胁迫下促进高粱种子萌发的最佳引发水势,可以有效减少盐胁迫引起的细胞膜损伤,保持了高粱种子胚芽线粒体结构的完整性,并提升了线粒体内抗氧化酶的活性,从而促进高粱种子耐盐萌发。

关键词:高粱; 种子引发; 萌发; 水势; 盐胁迫; 抗氧化代谢
中图分类号:S514　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-8151(2024)03-0049-10

在盐渍等边际土地条件下,不易保苗是影响高粱(*Sorghum bicolor* (L.) Moench)生产的难点之一,而种子萌发阶段对高粱幼苗的初期建成和最终产量的形成都有很大的影响[1]。研究表明,高粱种子萌发阶段对盐胁迫最为敏感[2],高浓度的盐分离子会降低种子周围环境的渗透势,从而抑制种子的吸水和胚胎的生长。此外,离子毒性还会破坏大分子物质,影响萌发过程中的正常生理代谢[3]。大量研究表明,盐胁迫会显著降低高粱种子活力,抑制萌发和幼苗早期生长[4-6]。因此,需要尽快提出促进种子在盐渍条件下萌发的有效方法,这对盐碱地作物生产尤为重要。

种子引发是指对种子进行特定的水化处理,激活种子内的若干代谢事件,然后再缓慢回干至种子初始含水量的一种播前预处理技术[7]。种子引发技术可以有效促进种子的萌发[8],特别是在逆境条件下更为明显,如老化种子[9],冷胁迫[10],盐胁迫[2]等。Chen和Arora[8]认为种子引发启动的胁迫耐受性主要通过预激活与萌发相关的活动(head-start of germination)或胁迫记忆(stress imprint)。从第一种策略来看,其本质接近启动种子真实的萌发状态,因为大多数在萌发过程中表达的基因/蛋白在种子引发过程中也表现出类似的变化模式。同时,种子引发可以诱导早期萌发时的主要代谢过程中的一些生理变化(诸如呼吸和能量代谢等)[10-12]。有研究表明种子引发提高了线粒体的活性及其超微结构的稳定性[9,13],而能量供应的维持是种子萌发过程中不可避免的关键因素。第二

收稿日期:2023-11-24　　**修回日期**:2024-03-14
基金项目:财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-06-14.5-A17);辽宁省藏粮于技重大专项(2023JH1/10200001-03-01);辽宁省教育厅一般项目(LSNFW202006)
作者简介:于文波,硕士,研究方向:高粱逆境生理研究,E-mail:ywb519610@163.com
*通信作者:周宇飞(ORCID:0000-0002-9688-1564),教授,博士生导师,E-mail:zhouyufei@syau.edu.cn

种策略是一种对种子的预先胁迫处理,虽然种子引发与后续胁迫的时间间隔较短,但是由于胁迫记忆所诱导的抗性分子机制却能持续很长时间[14]。胁迫记忆会通过某些特定生理过程得以实现,有研究表明,抗氧化系统的关键酶如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)等,会随着引发时间或者引发剂的浓度增加而提高[15]。综合2种策略,可以发现都与水/水势有关,预激活的过程必有水参与,由于引发水势变化产生的类似逆境效果可以激发胁迫记忆。

很多引发剂被证明可以有效促进逆境条件下的种子萌发过程,然而不可忽略的是各种引发剂亦包含了潜在的有效信号调节物质(如水杨酸、Ca^{2+}等)[2,10],这样很可能夸大甚至倍增了种子引发的作用。而水引发与种子萌发初期生理过程重合,由水引发激活的原初能量代谢信号及其进一步调控种子生长的生理过程仍未有更好的理解。尽管不同引发水势的效果存在差异[16],但不同作物种子萌发的吸水策略也不尽相同。因此,不同作物的引发水势条件也可能存在差别。高粱是世界五大谷物作物之一,是重要的粮食作物及酿造原料,也是盐碱地种植的先锋作物,揭示盐胁迫下有效促进高粱萌发的引发水势条件及其机理具有较强的理论和实践意义。由于水势、引发时间和植物种类等因素都会影响引发的效果,因此选择和优化最佳高粱种子引发条件是获得最佳引发效果的关键[17]。本研究旨在探索盐胁迫下不同引发水势对高粱种子萌发的影响;明确盐胁迫下促进高粱种子萌发的最佳水势引发条件;揭示盐胁迫下最佳水势引发促进高粱萌发的生理调控途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验于农业农村部东北地区作物栽培科学实验站进行,试验材料为高粱品种吉杂124,由吉林省农业科学院作物资源研究所提供。

1.2 试验设计

试验于室内进行,采用单因素完全随机设计。挑取籽粒饱满、大小一致的高粱种子,5%NaClO溶液消毒5 min,将种子冲洗干净,吸干种子表面水分。设5个引发处理(表1),即水势分别为0(P1)、-0.3(P2)、-0.6(P3)、-0.9(P4)和-1.2(P5)MPa的PEG-6000溶液,将种子放入不同水势的PEG溶液中引发,引发时间分别为8、12、16、20、24 h。种液比为1∶5,引发后将种子洗净,放到通风处回干至初始含水量(13%,w/w)。以无盐胁迫未引发的种子为对照(CK)、盐胁迫下未引发的种子为处理S。发芽和生长参数在培养第5 d测定,其余测定指标含水量、膜透性、离子含量和线粒体抗氧化酶活性均在最佳引发水势处理下的时间进行测定。

表1 引发水势和引发时间

Table 1 Priming osmotic potential and priming duration

处理 Treatment	盐浓度/(mmol·L^{-1}) Salinity	引发水势/MPa Priming water potential	引发时间/h Priming duration
CK	0	0	0
S	200	0	0
P1	200	0	8
P2	200	-0.3	12
P3	200	-0.6	16
P4	200	-0.9	20
P5	200	-1.2	24

1.3 测定指标与方法

将种子置于铺有滤纸的培养皿中,加入8 mL 200 mmol·L^{-1} NaCl溶液,每个处理设置3次重复,在温度25 ℃、湿度70%的黑暗培养箱中培养5 d。每天记录发芽种子数,以胚根长大于2 mm为标准,至第5 d测量幼苗的根长、芽长、根鲜重、芽鲜重、根干重、芽干重。发芽率(GR)、发芽势(GP)、发芽指数(GI)、活力指数(VI)通过以下公式计算:

$$GR=\frac{\text{当天发芽率}}{\text{供试种子数}}\times 100\%$$

$$GP=\frac{\text{第3 d发芽种子数}}{\text{供试种子数}}\times 100\%$$

$$GI=\sum\frac{\text{第t d发芽种子数}}{t}$$

$$VI=\text{发芽指数}\times\text{根鲜重}[4]$$

以上参数的相对值为处理值除以对照值。

t为处理天数。

1.3.1　高粱组织含水量及膜透性的测定

随机选取5个长势均匀的胚芽和胚根组织,切下其胚芽和胚根称重(FW)并记录,随后迅速将组织浸没在蒸馏水中浸泡24 h。用滤纸擦掉组织表面水分并称重(TW),将组织放在85 ℃烘箱内干燥24 h并称重(DW)。相对含水量(RWC)由以下公式计算:

$$RWC=\frac{FW-DW}{TW-DW}\times 100\%$$

将5个胚芽和根鲜组织切下并用蒸馏水多次清洗其表面,以去除多余电解质。25 ℃恒温浸泡24 h,使用电导率仪测量溶液的电导率值(EC1),最后将样品沸水20 min,测量电导率(EC2)。电解质渗透率(EL)计算公式如下:

$$EL=\frac{EC1}{EC2}\times 100\%$$

1.3.2　高粱组织内离子含量的测定

将组织样品烘干,研磨成粉末,取0.1 g样品在320 ℃消化炉中消化30 min,其间加入2次30%H_2O_2溶液至消化液透明澄清,待冷却后定容至100 mL,在火焰光度计上测定Na^+、K^+、Ca^{2+}的含量,重复3次。

1.3.3　高粱组织线粒体超微结构

将新鲜胚芽组织样品浸泡于4%戊二醛固定液。经过脱水、包埋、染色处理后,用透射电镜(日立H-7500)在10 000倍范围内观察样品切片,并拍摄其细胞及线粒体照片。

1.3.4　高粱组织线粒体的提取与纯化

将新鲜胚芽组织样品加入由50 mmol·L^{-1}磷酸盐缓冲液(pH 7.5)、0.3 mol/L甘露醇、0.5%(w/v)牛血清白蛋白(BSA)、0.5%(w/v)聚乙烯吡咯烷酮-40、0.2 mmol·L^{-1}EDTA-2Na和20 mmol·L^{-1}半胱氨酸组成的缓冲剂后研磨成匀浆。用离心机将匀浆在2000 g条件下离心10 min,吸取上清液,重复2次。再将上清液在12 000 g条件下离心15 min,使沉淀物悬浮在缓冲剂中,重复2次。使用线粒体粗提取液进行酶活性的测定。

1.3.5　高粱组织线粒体抗氧化酶系统的测定

将0.2 g新鲜胚芽组织样品加入pH为7.8的50 mmol·L^{-1}磷酸钾缓冲液充分研磨。研磨后的提取液转入离心管中,粗提取液在4 ℃的离心机内以24 200 g离心1 min。取上清液进行测定,超氧化物歧化酶(SOD)测定参照Beyer[18]的方法,过氧化物酶(POD)测定参照Fielding[19]的方法、过氧化氢酶(CAT)测定参照Aebi[20]的方法、抗坏血酸过氧化物酶(APX)测定参照Amako[21]的方法。

1.4　数据分析

利用Excel 2019软件进行数据整理,使用Origin 2018对数据进行分析,采用SPSS 18.0软件进行单因素方差分析(ANOVA)和主成分分析(PCA),不同字母表示有显著性差异($P<0.05$)。

2　结果与分析

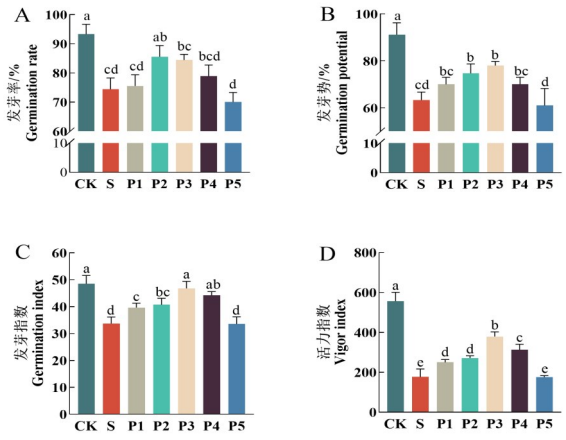
2.1　最佳引发水势的筛选

2.1.1　盐胁迫下不同水势引发后高粱种子发芽指标

如图1A,S处理与CK处理相比发芽率显著下降了20.23%;在盐胁迫下,P2引发处理的高粱种子发芽率最高,其次为P3。P2的发芽率为87.67%,与P3相比升高6.49%,且与其它处理相比有显著性差异;S处理与CK处理相比发芽势显著下降了30.49%;5种引发处理的发芽势变化趋势与发芽率一致。发芽势最高的处理为P3,其次是P2,P3比发芽势最低的P5升高了27.28%,与其它处理呈显著差异(图1B);图1C所示,S处理与CK处理相比发芽指数显著下降了29.59%;引发处理中发芽指数最高的处理为P3,与其它引发处理呈显著性差异。P3的发芽指数分别比P1、P2、P4和P5高出17.91%、14.96%、5.85%和39.6%;S处理与CK处理相比活力指数显著下降75.21%;引发处理中活力指数最高的为P3,其次为P2,都显著高于其它处理。与活力指数最低的P5相比,分别升高了54.50%和35.04%(图1D)。

2.1.2　盐胁迫下在不同水势引发后高粱种子萌发性状

盐胁迫下不同引发处理的芽长如图2A,其中P3的芽长表现最优,其次为P4,P3比表现最差的P5处理显著提升67.08%;芽鲜重和芽干重在5种引发处理中都是P3最高,且P5处理为最低,P3与P5相比,芽鲜重和芽干重分别显著提高87.89%和58.67%(图2B~2C)。根长最长的处理为P3处理,其次为P4处理,分别与其它处理差异显著,与P1、



CK:无盐胁迫,未引发;S:盐胁迫,未引发;P1:0 MPa水势下引发8 h;P2:−0.3 MPa水势下引发12 h;P3:−0.6 MPa下引发16 h;P4:−0.9 MPa下引发20 h;P5:−1.2 MPa下引发24 h。不同字母表示差异显著($P<0.05$)

CK: no salt stress, not triggered; S: salt stress, unprovoked; P1: 8 hours at 0 MPa osmotic potential; P2: −0.3 MPa osmotic potential for 12 hours; P3: −0.6 MPa for 16 hours; P4: −0.9 MPa for 20 hours; P5: −1.2 MPa for 24 hours. Bars with different letters indicated significant differences in the same graph at $P<0.05$ level

图1 盐胁迫下不同水势引发后高粱种子发芽指标

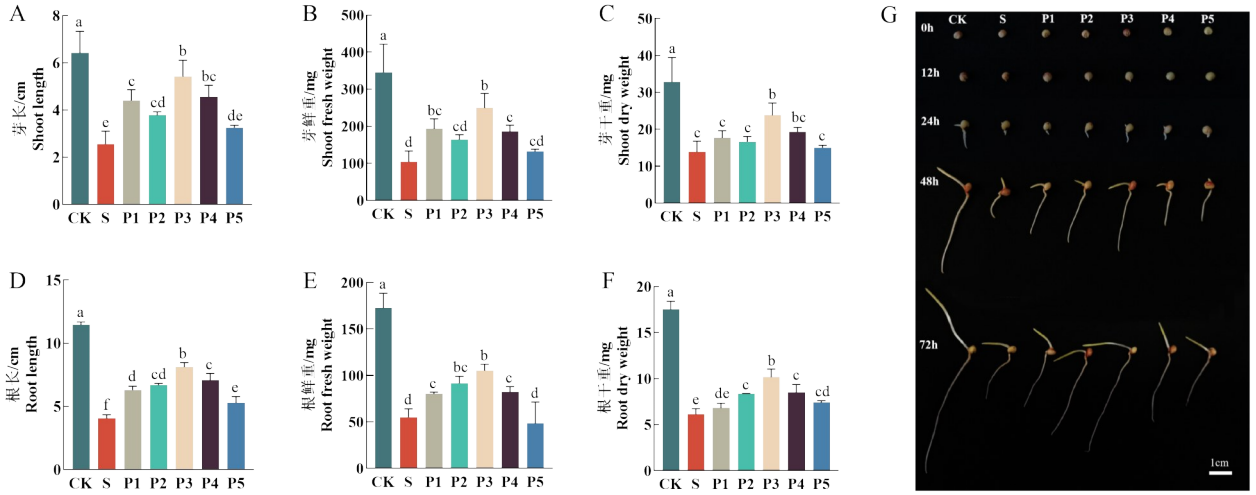
Fig.1 Germination indexes of sorghum seeds after different osmotic potentials primingunder salt stress

P2和P5相比,P3显著高出28.53%、21.41%、53.60%(图2D)。根鲜重和根干重表现最佳的为P3处理,与表现最差的P5相比,分别高出117.68%和37.43%(图2E~2F);如图2G所示,NaCl胁迫抑制了高粱种子根和胚芽的伸长,当种子萌发至48 h时,S处理的根长和胚芽长度明显小于CK,而在引发处理后,盐胁迫下的种子在根和胚芽的伸长方面均有不同程度的显著提升。当种子萌发至72 h时,各个处理之间的差异更加明显,其中P3在根和胚芽的长度最大,其次为P2。

2.1.3 盐胁迫下不同水势引发处理的高粱种子萌发效果的主成分分析

采用主成分分析(PCA)评价不同种子引发条件对盐胁迫下高粱萌发性状的影响(图3)。主成分Ⅰ的贡献率达到84.40%,主成分Ⅱ的贡献率为12.12%,累计贡献率达到96.51%,说明2个主成分可以代表大部分的变量。引发处理的综合得分在PC1轴上排序为P3>P2>P4>P1>P5,根据左侧的PC2轴可得知另一主成分各处理得分排序。

各因子载荷矩阵(表2)表示了主成分Ⅰ和主成分Ⅱ与各指标的相关性。对于主成分Ⅰ影响最大的主要指标包括X3、X4、X5、X6、X8、X10,负荷量分别为0.967、0.996、0.975、0.962、0.967、0.989。对于主成分Ⅱ影响最大的主要指标包括X1、X2、X3,负荷量分别为0.422、0.857、0.184。经过分析,得出主成分Ⅰ和主成分Ⅱ的各因子得分系数(表3),推导出因子得分公式:



CK:无盐胁迫,未引发;S:盐胁迫,未引发;P1:0 MPa水势下引发8 h;P2:−0.3 MPa水势下引发12 h;P3:−0.6 MPa下引发16 h;P4:−0.9 MPa下引发20 h;P5:−1.2 MPa下引发24 h。不同字母表示差异显著($P<0.05$)

CK: no salt stress, not triggered; S: salt stress, unprovoked; P1: 8 hours at 0 MPa osmotic potential; P2: −0.3 MPa osmotic potential for 12 hours; P3: −0.6 MPa for 16 hours; P4: −0.9 MPa for 20 hours; P5: −1.2 MPa for 24 hours. Bars with different letters indicated significant differences in the same graph at $P<0.05$ level.

图2 盐胁迫下在不同水势引发后高粱种子萌发性状

Fig.2 Germination characteristics of sorghum seeds after priming at different osmotic potentials under salt stress

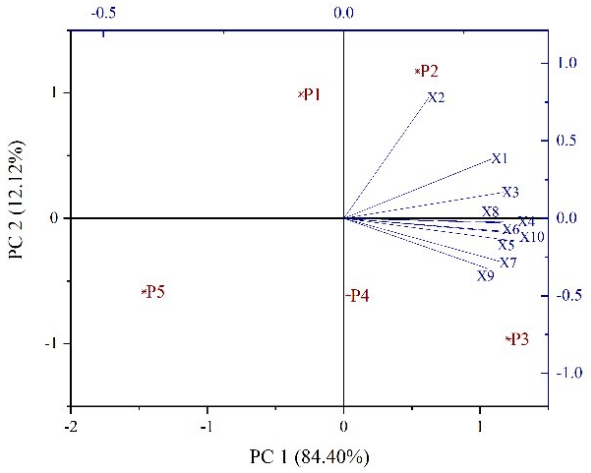


图3　盐胁迫下不同水势引发种子生长的主成分分析

Fig.3　Principal component analysis of seed growth after priming at different osmotic potentials under salt stress

Y1=0.309X1+0.177X2+0.333X3+0.343X4+0.336X5+0.331X6+0.325X7+0.333X8+0.300X9+0.340X10

Y2=0.308X1+0.778X2+0.167X3−0.031X4−0.138X5−0.083X6−0.278X7−0.024X8−0.325X9−0.092X10

单一的某个成分不能评价盐胁迫下水引发处理对高粱种子萌发的影响,综合Y1与Y2得到最终因子得分函数:

Y=0.84Y1+0.12Y2

将各处理的指标相对值代入综合因子得分函数中,得到了综合因子得分的排序(表4),由表4可看出得分最高的最优处理为P3处理。

2.2　盐胁迫下最佳水势引发后的高粱组织生理特性

2.2.1　盐胁迫下最佳水势引发后高粱组织相对含水量和电导率

由图4可知,与CK处理相比,盐胁迫下S处理的相对含水量显著降低12.10%、相对电导率显著提高93.22%。P3处理与S处理相比,相对含水量显著提升3.78%,相对电导率显著下降23.48%。

2.2.2　盐胁迫下最佳水势引发后高粱组织离子平衡

由表5可见,与CK处理相比,盐胁迫使S处理的Na^+含量显著上升273.74%、K^+含量显著上升26.73%、Ca^{2+}含量显著下降77.43%,K^+/Na^+含量显著下降65.46%,Ca^{2+}/Na^+含量显著下降93.48%。经PEG最佳浓度引发之后,P3与S相比,Na^+含量下降39.69%、K^+含量上升9.59%,但未达到显著水平、Ca^{2+}含量上升48.65%,差异不显著、K^+/Na^+含量显著上升64.52%,Ca^{2+}/Na^+含量上升133.33%,未达到显著水平。

表2　各因子载荷矩阵

Table 2　Loading matrix of each component

主成分 Principal component	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10
Ⅰ	0.090	0.513	0.967	0.996	0.975	0.962	0.944	0.967	0.873	0.989
Ⅱ	0.422	0.857	0.184	−0.034	−0.152	−0.091	−0.306	−0.026	−0.358	−0.101

表3　因子得分系数矩阵

Table 3　Coefficient matrix of component score

主成分 Principal component	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10
Ⅰ	0.106	0.061	0.115	0.118	0.116	0.114	0.112	0.115	0.103	0.117
Ⅱ	0.349	0.707	0.152	−0.028	−0.125	−0.075	−0.252	−0.022	−0.295	−0.084

注:X1:相对发芽率;X2:相对发芽势;X3:相对萌发指数;X4:相对活力指数;X5:相对根长;X6:相对芽长;X7:相对根鲜重;X8:相对芽鲜重;X9:相对根干重;X10:相对芽干重

Note: X1: Relative germination rate; X2: relative germination potential; X3: relative germination index; X4: relative vigor index; X5: relative root length; X6: relative bud length; X7: relative root fresh weight; X8: relative bud fresh weight; X9: relative root dry weight; X10: relative bud dry weight

2.2.3　盐胁迫下最佳水势引发后高粱组织线粒体超微结构

盐胁迫破坏了高粱胚芽内线粒体完整性(图5)。未受盐胁迫(CK)时,线粒体结构清晰、完整;盐胁迫(S)下,线粒体完整性被破坏,大面积空泡化,线粒体膜缺失,嵴结构被破坏。P1和P5处理后与CK相比线粒体肿胀程度增加,结构出现降解和畸形等异常现象;P2、P4处理后与CK相比略微

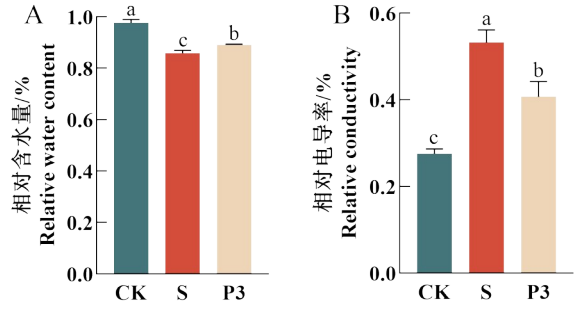
表4 综合各因子得分

Table 4 Y—value of comprehensive component score

处理 Treatment	Y_1	Y_2	Y	排序 Order
P1	−0.91	1.09	−0.633 6	4
P2	1.57	1.29	1.473 6	2
P3	3.51	−1.06	2.821 2	1
P4	0.09	−0.68	−0.00 6	3
P5	−4.26	−0.64	−3.655 2	5

注:P1为0 MPa水势下引发8 h;P2为−0.3 MPa水势下引发12 h;P3为−0.6 MPa水势下引发16 h;P4为−0.9 MPa水势下引发20 h;P5为−1.2 MPa水势下引发24 h

Note: P1 is 8 hours at 0 MPa osmotic potential; P2 was −0.3 MPa for 12 hours. P3 was −0.6 MPa for 16 hours. P4 was −0.9 MPa for 20 hours. P5 was −1.2 MPa for 24 hours



CK:无盐胁迫,未引发;S:盐胁迫,未引发;P3:盐胁迫,−0.6 MPa水势下引发16小时。不同字母表示差异显著($P<0.05$)

CK: no salt stress, not triggered; S: salt stress, unprovoked; P3: Salt stress, −0.6 MPa osmotic potential for 16 hours. Different letters indicate significant differences ($P<0.05$)

图4 盐胁迫下最佳水势引发后高粱组织相对含水量和电导率

Fig.4 Water content and electrical conductivity of sorghum tissues after optimal osmotic potential priming under salt stress

肿胀,但结构正常。经最佳引发处理(P3)后,线粒体较CK处理结构相对完整,嵴呈现连续状态。

2.2.4 盐胁迫下最佳水势引发后高粱组织线粒体抗氧化酶活性

图6A可见,S处理与对照处理相比降低了26.53%,在P3处理后的种子胚芽线粒体内的SOD与S处理相比提高19.87%,均呈现显著性差异。图6B可见,P3处理后的种子胚芽线粒体内的POD活性与S处理的种子胚芽相比显著提高14.84%。图6C可见,与CK相比,S处理下线粒体内CAT活性显著下降43.04%。与S相比,经过P3处理的线粒体内CAT活性显著提高了41.96%。图6D可见,与CK相比,S处理线粒体内APX活性显著下降了44.68%。与S相比,P3处理的线粒体内APX活性显著提高了50.80%。

3 讨论

高粱萌发期对盐胁迫极为敏感[4]。本试验中,盐胁迫显著影响了高粱种子的萌发过程,表现为发芽率、发芽势、发芽指数和活力指数等发芽特征显著降低,表明盐胁迫降低了高粱种子活力,进而抑制了种子萌发。盐胁迫延迟和抑制种子萌发的原因是多方面的。首先,盐胁迫由于渗透和离子毒害破坏膜系统的影响,严重降低了种子的发芽率,限制了种子萌发过程。其次,盐胁迫可能通过多种机制(如抑制能量代谢等)降低种子萌发过程中储备动员的效率[22]。然而,有报道称以PEG模拟不同水势引发处理后,玉米种子在盐胁迫下萌发的时间显著缩短,发芽率和发芽指数显著提高,说明水引发提高了盐胁迫下的玉米种子活力[23]。Chen等[2]研究表明,盐胁迫下不同介质的引发剂都有促进高粱种子萌发的效果(包括水引发),且不同浓度引发剂的引发效果存在显著差异,说明引发剂的作用浓度存在最佳范围,可能是激活种子萌发早期的代谢过程需要特定介质浓度或水势条件。本研究中主成分分析结果也证明,盐胁迫下不同水势的种子引发效果存在显著差异(图3)。

植物受到盐胁迫会发生脱水现象,从而影响体内含水量,因此,相对含水量可作为衡量植物耐盐性的生理指标[24]。本研究中,盐胁迫下高粱在

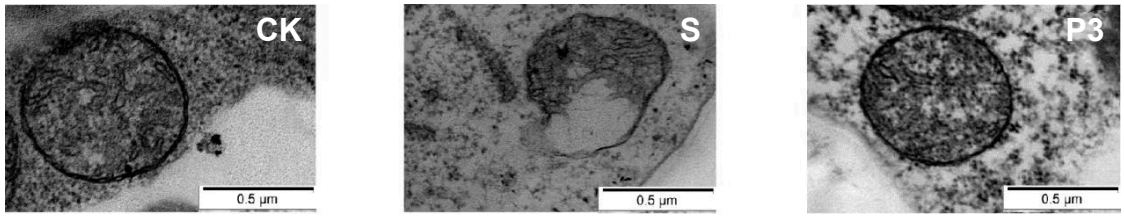
表5 盐胁迫下最佳水势引发后高粱组织离子平衡

Table 5 Ion equilibrium in sorghum tissues after optimal osmotic potential induced under salt stress

处理 Treatment	Na^+/(mg•g^{-1} DM)	K^+/(mg•g^{-1} DM)	Ca^{2+}/(mg•g^{-1} DM)	K^+/Na^+	Ca^{2+}/Na^+
CK	3.58±0.43c	12.83±0.21b	1.64±0.14a	3.59±0.18a	0.46±0.07a
S	13.38±2.42a	16.26±0.06a	0.37±3.58b	1.24±0.13c	0.03±0.01b
P3	8.07±0.45b	17.82±0.04a	0.55±0.19b	2.20±0.04b	0.07±0.01b

注:同一列不同小写字母,表示在5%水平差异显著,CK:未引发+无胁迫;S:未引发+盐胁迫;P3:−0.6 MPa水势下引发16 h

Note: Different lowercase letters in the same column indicate a significant difference at the 5% level, CK: unprovoked + no stress; S: unprovoked + salt stress; P3: −0.6 MPa for 16 hours

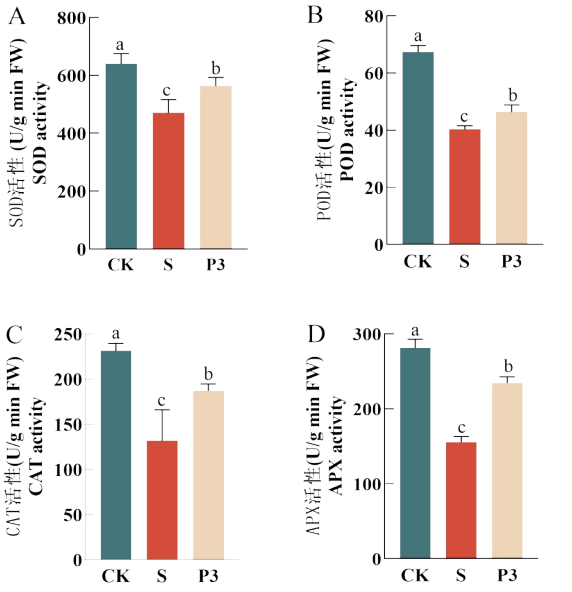


CK:无盐胁迫,未引发;S:盐胁迫,未引发;P3:盐胁迫,−0.6 MPa水势下引发16 h。不同字母表示差异显著($P<0.05$)

CK: no salt stress, not triggered; S: salt stress, unprovoked; P3: Salt stress, −0.6 MPa water potential for 16 hours. Different letters indicate significant differences ($P<0.05$)

图5　盐胁迫下最佳水势引发后高粱组织线粒体超微结构

Fig.5　Mitochondrial ultrastructure of sorghum tissue after optimal osmotic priming under salt stress



CK:无盐胁迫,未引发;S:盐胁迫,未引发;P3:盐胁迫,−0.6 MPa水势下引发16 h,不同字母表示差异显著($P<0.05$)

CK: no salt stress, not triggered; S: salt stress, unprovoked; P3: Salt stress, −0.6 MPa osmotic potential for 16 hours. Different letters indicate significant differences ($P<0.05$)

图6　盐胁迫下最佳水势引发后高粱组织线粒体抗氧化酶活性

Fig. 6　Mitochondrial antioxidant enzyme activity in sorghum tissue after optimal osmotic priming under salt stress

萌发过程中胚芽的含水量有所下降,膜透性增大,电导率也相应增大,说明盐胁迫已经影响了高粱组织的水分平衡,细胞结构受到损伤。王宇[25]研究发现,100 mmol·L^{-1} NaCl胁迫下10% PEG处理后的水稻幼苗叶片含水量高于未处理幼苗,说明10%PEG处理能够提高植物的含水量,从而提高耐盐性。在种子萌发过程中保持一定的渗透势,为种子吸水过程提供一个良好的环境,可以防止由于种子吸水速度过快或缺水而引起细胞膜损伤,从而造成胞内溶质的外渗[26]。本研究发现,最佳水势引发后的高粱胚芽内含水量增加,相对电导率下降,高粱组织的水分状况在一定程度上能够反映其生长的代谢强度,并表现在高粱的萌发特征上(图1),这也是最佳水势引发促进盐胁迫下高粱萌发的重要原因。调节离子平衡是作物耐盐的另一个重要原因,特别反映在种子引发使Na^+含量降低,K^+含量增加[27]。Shabala和Pottosin[28]研究指出,植物在受到盐胁迫时,细胞质中保持较高的K^+/Na^+以维持离子平衡。本研究中,盐胁迫使高粱组织中的Na^+含量增加,最佳水势引发使高粱组织中的Na^+含量减少、K^+含量增加,K^+/Na^+升高,从而有效调节了盐胁迫下高粱组织的离子平衡,提高了耐盐性。

线粒体是植物能量代谢的中心,为植物对胁迫的应激反应提供能量,因此线粒体的耐盐性也很重要[29]。马静等[30]研究发现,盐胁迫下烤烟叶片线粒体被膜会受到一定程度的损伤,内部间隙逐渐增大,嵴数目减少,且发育较差。完整、健康的线粒体是细胞正常代谢的前提,盐胁迫破坏了线粒体的结构与功能,是使ATP的供应达不到代谢需求的主要原因[31]。本研究发现PEG最佳浓度引发后,线粒体的完整性得到改善,盐胁迫对植物的损伤也相对减弱(图5)。Masondo等[32]研究同样表明,种子引发能促进盐胁迫下胚轴细胞内的线粒体修复,使线粒体功能恢复正常。线粒体内膜上的电子传递链是产生活性氧的主要部位,正常情况下活性氧的产生和清除是平衡的,但盐胁迫下破坏了线粒体活性氧的产生和清除平衡,造成种子活性氧的积累从而导致氧化应激[33-34]。活性氧的增加会对细胞造成结构性损伤,植物ROS清除系统在维持细胞氧化还原稳态方面起着至关重要的作用[35]。本试验中,最佳水势引发之后的高粱胚轴线粒体的抗氧化酶活性均显著高于未引发处理,说明最佳水势引发可以增强线粒体内抗

氧化酶的活性,从而保证线粒体结构的完整性,进而维持其功能的稳定性。

4 结论

通过最佳水势的筛选,发现盐胁迫下5种引发水势均能促进高粱种子的萌发,其中-0.6 Mpa水势引发效果最佳。最佳水势引发提高了盐胁迫下的高粱胚芽的含水量,降低了膜透性,维持了胚芽内的离子平衡,增强了线粒体内抗氧化酶的活性,以及保持了线粒体结构完整性,从而促进了高粱种子的萌发。

参考文献

[1]Zhu G L, An L L, Jiao X R, et al. Effects of gibberellic acid on water uptake and germination of sweet sorghum seeds under salinity stress[J]. Chilean Journal of Agricultural Research, 2019,79(3):415-424.

[2]Chen X F, Zhang R D, Xing Y F, et al. The efficacy of different seed priming agents for promoting sorghum germination under salt stress[J]. PLoS One, 2021,16(1):e0245505.

[3]Li J P, Zhao C, Zhang M J, et al. Exogenous melatonin improves seed germination in *Limonium bicolor* under salt stress [J]. Plant Signaling & Behavior, 2019,14(11):1659705.

[4]孙璐,周宇飞,李丰先,等. 盐胁迫对高粱幼苗光合作用和荧光特性的影响[J]. 中国农业科学,2012,45(16):3265-3272.
Sun L, Zhou Y F, Li F X, et al. Impacts of salt stress on characteristics of photosynthesis and chlorophyll fluorescence of *Sorghum* seedlings[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45 (16):3265-3272.

[5]孙璐,周宇飞,汪澈,等. 高粱品种萌发期耐盐性筛选与鉴定[J]. 中国农业科学,2012,45(9):1714-1722.
Sun L, Zhou Y F, Wang C, et al. Screening and identification of *Sorghum* cultivars for salinity tolerance during germination[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012,45(9):1714-1722.

[6]Sun L, Wang C, Zhou Y F, et al. Inhibition of SbABI5 expression in roots by ultra-high endogenous ABA accumulation results in *Sorghum* sensitivity to salt stress[J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2016,18(1):146-154.

[7]Heydecker W, Higgins J, Gulliver R L. Accelerated germination by osmotic seed treatment[J]. Nature, 1973, 246: 42-44.

[8]Chen K, Arora R. Priming memory invokes seed stress-tolerance[J]. Environmental and Experimental Botany, 2013, 94:33-45.

[9]Xia F S, Wang M Y, Chen L L, et al. Responses of mitochondrial ultrastructure and physiological variations to PEG-priming on ultra-dried oat (*Avena sativa* L.) seeds after ageing [J]. Seed Science and Technology, 2017, 45(3):622-637.

[10]Nie L X, Liu H Y, Zhang L, et al. Enhancement in rice seed germination via improved respiratory metabolism under chilling stress[J]. Food and Energy Security, 2020, 9(4):e234.

[11]Soeda Y, Konings M C J M, Vorst O, et al. Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming, and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level[J]. Plant Physiology, 2005, 137(1):354-368.

[12]Weitbrecht K, Müller K, Leubner-Metzger G. First off the mark: early seed germination[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(10):3289-3309.

[13]Xia F S, Cheng H, Chen L L, et al. Influence of exogenous ascorbic acid and glutathione priming on mitochondrial structural and functional systems to alleviate aging damage in oat seeds[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1):104.

[14]Hussain S, Zheng M M, Khan F, et al. Benefits of rice seed priming are offset permanently by prolonged storage and the storage conditions[J]. Scientific Reports, 2015, 5:8101.

[15]Lei Y B, Song S Q, Fu J R. Possible involvement of anti-oxidant enzymes in the cross-tolerance of the germination/growth of wheat seeds to salinity and heat stress[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2005, 47(10):1211-1219.

[16]夏方山,毛培胜,王明亚,等. PEG引发对老化燕麦种子抗氧化性能的影响[J]. 草地学报,2016,24(5):933-938.
Xia F S, Mao P S, Wang M Y, et al. Effect of PEG priming on oxidation resistance of aged oat seeds[J]. Acta Agrestia Sinica, 2016, 24(5):933-938.

[17]Theerakulpisut P, Nounjan N, Kumon-Sa N. Spermidine priming promotes germination of deteriorated seeds and reduced salt stressed damage in rice seedlings[J]. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 2021, 49(1): 12130.

[18]Beyer W F Jr, Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 161(2): 559-566.

[19]Fielding J L, Hall J L. A biolchemical and cytochemical study of peroxidase activity in roots of *Pisum sativum*: i. a comparison of dab-peroxidase and guaiacol-peroxidase with particular emphasis on the properties of cell wall activity[J]. Journal of Experimental Botany, 1978, 29(4):969-981.

[20]Aebi H. Catalase *in vitro*[J]. Methods in Enzymology, 1984, 105:121-126.

[21]Amako K, Chen G X, Asada K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants[J]. Plant and Cell Physiology, 1994, 35(3):497-504.

[22]Yohannes G, Kidane L, Abraha B, et al. Effect of salt stresses on seed germination and early seedling growth of *Camelina sativa* L[J]. Momona Ethiopian Journal of Science, 2020, 12 (1):1-19.

[23]Castañón-Nájera G, Latorunerie-Moreno L, Gálvez Muñoz Y A. Effect of PEG8000 and NaCl on germination and seedling traits of tropical maize (*Zea mays* L.)[J]. Phyton, 2017, 86(1):290-295.

[24]Vazayefi M, Shekari F, Zangani E, et al. Seed treatment with chlormequat chloride improves the physiological and biochemical characteristics of *Brassica napus* L. under salt stress[J]. Plant Stress, 2023, 9:100175.

[25]王宇. 在PEG预处理下水稻幼苗对NaCl及NaCl+PEG联合胁迫的生理响应[D]. 沈阳:沈阳师范大学, 2013.
Wang Y. Biophysical response of PEG pretreatment on rice seeding under salt stress or combined stresses of salt and PEG [D]. Shenyang: Shenyang Normal University, 2013.

[26]王曙光,赵建奎,宁幸莲,等. PEG-6000引发对老化大豆种子膜透性及保护性酶活性的影响[J]. 华北农学报, 2012, 27(6):113-117.
Wang S G, Zhao J K, Ning X L, et al. Effect of PEG-6000 priming on seed membrane permeability and the activity of protection enzyme of aging soybean[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2012, 27(6):113-117.

[27]Bajwa A A, Farooq M, Nawaz A. Seed priming with sorghum extracts and benzyl aminopurine improves the tolerance against salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2018, 24(2):239-249.

[28]Shabala S, Pottosin I. Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance[J]. Physiologia Plantarum, 2014, 151(3):257-279.

[29]Sun Y F, Liang W H, Cheng H, et al. NADPH oxidase-derived ROS promote mitochondrial alkalization under salt stress in *Arabidopsis* root cells[J]. Plant Signaling & Behavior, 2021, 16(3):1856546.

[30]马静,王静,姚鹏伟,等. 盐分胁迫对烤烟叶片亚细胞结构及生理生化指标的影响[J]. 中国烟草学报, 2019, 25(5):44-52.
Ma J, Wang J, Yao P W, et al. Effects of salt stress on subcellular structure and physiological and biochemical indexes of flue-cured tobacco leaves[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2019, 25(5):44-52.

[31]廖珍凤,王剑,宋西娇,等.盐胁迫对大豆种子萌发过程中子叶超微结构的影响[J].浙江农业科学, 2022, 63(06):1250-1256,1261.
Liao Z F, Wang J, Song X J, et al. Effect of salt stress on the ultrastructrue of cotyledon cells during soybean germination [J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2022, 63(06):1250-1256,1261.

[32]Masondo N A, Kulkarni M G, Finnie J F, et al. Influence of biostimulants-seed-priming on *Ceratotheca triloba* germination and seedling growth under low temperatures, low osmotic potential and salinity stress [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 147:43-48.

[33]李迎春. 盐胁迫下四倍体刺槐线粒体的响应机制[D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2014.
Li Y C. The response mechanism of mitochondria in tetraploid *Robinia pseudoacacia* under salt stress[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2014.

[34]Cembrowska-Lech D, Rybak K. Nanopriming of barley seeds-a shotgun approach to improve germination under salt stress conditions by regulating of reactive oxygen species[J]. Plants, 2023, 12(2):405.

[35]Li J N, Yu B, Ma C Q, et al. Functional characterization of sugar beet M14 antioxidant enzymes in plant salt stress tolerance[J]. Antioxidants, 2022, 12(1):57.

Optimal osmotic potential for salt tolerance germination of sorghum seeds and its physiological effects

Yu Wenbo[1], Cui Tong[1], Xing Yifan[1], Bo Yushan[1], Chen Xiaofei[1,2], Liu Chang[1], Shi Xiaolong[1], Liu Chunjuan[1], Zhou Yufei[1*]

(*1.College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2.Institute of Crops, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230001, China*)

Abstract: [Objective]Salt stress is one of the important abiotic stress factors inhibiting the germination of sorghum seed. Seed priming can effectively promote the germination of sorghum seeds under salt stress. However, there is limited research on the optimal priming osmotic potential conditions and their effect on physiological regulation during germination. [Method]In this experiment, different priming osmotic potentials were simulated using PEG-6000, including 0 (P1), −0.3 (P2), −0.6 (P3), −0.9 (P4) and −1.2 MPa (P5), under 25 ℃ to study the germination characteristics of sorghum seeds under salt stress (200 mmol· L^{-1} NaCl). Principal component analysis was used to identify the optimal priming osmotic potential conditions and explore their physiological regulatory effects. [Result]Under salt stress, sorghum seeds primed with P3 showed higher germination vigor, germination index, vigor index, root length, shoot length, root dry weight, root fresh weight, shoot dry weight, and shoot fresh weight compared to other treatments. Additionally, the principal component analysis showed that P3 had the highest comprehensive factor score, indicating it as the optimal priming osmotic potential condition. Compared to unprimed seeds, sorghum seeds primed with P3 showed a significant increase in relative water content and a decrease in relative conductivity in the shoot. Fur-

thermore, the K^+/Na^+ and Ca^{2+}/Na^+ ratio in the shoot increased significantly ($P<0.05$) under P3 priming. Moreover, priming with P3 maintained the relative integrity of mitochondria during sorghum seed germination under salt stress. The activities of antioxidant enzymes such as Superoxide dismutase(SOD), Peroxidase (POD), Catalase (CAT) and Ascorbate peroxidase (APX) in mitochondria were significantly increased, indicating that priming with P3 enhanced the antioxidant capacity of mitochondria during sorghum seed germination under salt stress. [Conclusion] −0.6 Mpa(P3) was the optimal osmotic potential for promoting the germination of sorghum seeds under salt stress. It can effectively reduce the cell membrane damage caused by salt stress, maintain the integrity of the mitochondrial structure in sorghum seed embryos, and enhance the activity of antioxidant enzymes in mitochondria, thereby promoting the salt-tolerant germination of sorghum seeds.

Keywords: Sorghum, Seed-priming, Germination, Water potential, Salt stress, Antioxidant metabolism

(编辑:郭玥微)