

樟树成熟种子超低温保存研究

马健¹, 叶润燕², 张俊红³

(1. 胶州市自然资源局, 山东胶州 266300; 2. 浙江省杭州育新高级中学, 浙江杭州 310000; 3. 浙江农林大学, 浙江临安 311300)

摘要 [目的] 研究樟树成熟种子保存的最佳方法。[方法] 利用正交试验对樟树种子进行超低温保存, 探讨樟树成熟种子保存的最佳方法。[结果] 樟树种子超低温保存过程中种子最佳含水量为 26%; 在樟树种子超低温保存过程中, 15% 二甲亚砜是最好的冷冻保护剂之一; 最利于樟树种子超低温保存的解冻方式是慢冻和慢解冻。[结论] 该研究为研究樟树种子超低温保存提供理论依据。

关键词 樟树; 超低温; 保存

中图分类号 S 792.23 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)09-0170-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.09.049



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Cryopreservation of *Cinnamomum camphora* Presl Mature SeedsMA Jian¹, YE Run-yan², ZHANG Jun-hong³ (1. Jiaozhou Bureau of Natural Resources, Jiaozhou, Shandong 266300; 2. Hangzhou Yuxin Senior High School, Hangzhou, Zhejiang 310000; 3. Zhejiang A&F University, Lin'an, Zhejiang 311300)

Abstract [Objective] To study the best method and conditions to protect the seed activity of *Cinnamomum camphora* Presl in the process of seed preservation. [Method] The seeds of *C. camphora* were cryopreserved by orthogonal test, and the conductivity of the preserved seeds and the dehydrogenase *in vitro* were determined. [Result] 26% was the optimal water content of camphor seeds in the process of cryopreservation. 15% dimethyl sulfoxide was one of the best cryoprotectants in the cryopreservation of *C. camphora*. Slow freezing and slow thawing were the most favorable methods for the cryopreservation of seeds. [Conclusion] This study could provide theoretical basis for the study on the cryopreservation of *C. camphora* seeds.

Key words *Cinnamomum camphora* Presl; Ultra-low temperature; Conservation

随着原始森林面积的锐减, 大量物种种质资源不断流失, 尤其是木本种植资源, 所以对木本种植资源的保存开始受到越来越多的关注。种子作为木本植物种质资源保存最普遍也是最佳的保存材料之一, 在珍稀树种种植资源的保存中发挥着越来越大的作用。但珍稀树种的种子大多为顽拗性种子, 目前采用常规方法难以长期保存, 而超低温保存则多次在顽拗性种子中获得成功^[1-4]。笔者采用正交试验对樟树种子进行超低温保存, 并对其保存后的种子进行电导率测定以及对其离体胚进行脱氢酶测定, 探讨在保存过程中最利于保护种子活性的方法和条件, 以期为实现樟树种子长期贮藏提供科学依据。

1 材料与与方法**1.1 材料** 试验所用种子为 20~30 年生, 生长健壮、无病虫

害的优良樟树单株上采摘的成熟果实。

1.2 含水量测定

1.2.1 绝对含水量测定。 根据国际林木种子检验规程(SI-AT)的规定, 采用 105 °C 烘干 8 h 来测定绝对含水量。 $\omega_0 = (\text{鲜重} - \text{绝干重} / \text{鲜重}) \times 100\%$

1.2.2 实际含水量测定。 每组选择大小均匀、颗粒饱满、无损伤的樟树种子 10 颗, 每个梯度测定 3 组, 共 12 组, 放入 30 °C 烘干箱中加硅胶使种子失水至实际含水量分别为 33%、26%、20%、14%。试验同时测定种子的绝对含水量, 失水过程中经常更换硅胶。实际含水量采用减重法计算: $\omega_1 = 100\% - [\text{最初重量} \times (100\% - \text{相对含水量})] / \text{最后重量}$ 。

1.3 冷解冻程序 樟树种子超低温保存的冷解冻程序如图 1 所示。

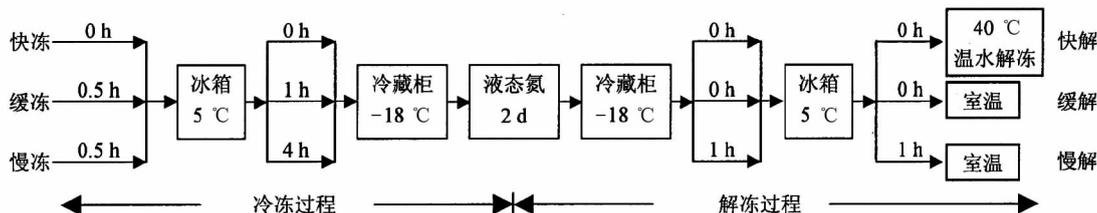


图 1 冷冻和解冻程序

Fig. 1 Freezing and thawing procedure

1.4 相对电导率的测定 选择大小均匀、颗粒饱满、无损伤的种子 10 颗, 称重后用自来水冲洗, 再用蒸馏水冲洗数次, 用滤纸吸干浮水, 分别装入 50 mL 试管中加入 10 mL 重蒸水浸泡, 再用 DDS-307 型电导率仪先测定电导值, 即为初始值

(a_1), 此后每隔 4 h 测定电导率(a_2), 同时记录水温, 直至 24 h 结束。然后, 将浸泡液连同种子在沸水中煮 15 min, 冷却至 25 °C 后再测定电导率(a_3)。以不加种子的重蒸水为空白对照。按以下公式计算绝对电导率: 绝对电导率($\mu\text{S}/\text{cm}$) = (种子电导率测定值 - 空白对照的电导率) × 电极常数^[5]; 然后, 换算为 25 °C 时电导率: 25 °C 电导率 = 电导率 × [1 + 0.02 × (t - 25)]^[6]; 按以下公式计算相对电导率: 相对电导率 S_r (%) =

作者简介 马健(1983—), 女, 山东临朐人, 工程师, 博士, 从事林业相关工作。

收稿日期 2019-03-13

$S_1/S_2 \times 100$, 式中 S_1 为 25 °C 电导率, S_2 为绝对电导率。

1.5 脱氢酶活性(TTC 含量)的测定 取待测种子 3 个重复, 每重复 20 粒种子, 在 45 °C 温水中浸种 24 h (以增强离体胚的呼吸强度, 使其迅速显色), 取胚放入 10 mL 试管中, 加入 5 mL 0.1% TTC 溶液, 加盖, 在 37 °C 黑暗条件染色 8 h, 充分染色后, 倒出 TTC 溶液, 并用蒸馏水冲洗 3 次。然后, 再将样品中加入丙酮及少许石英充分研磨。将研磨液倒入 2 mL 的试管中, 用丙酮定容。将试管置于 4 000 r/min 下离心

10 min。取上清液在 490 nm 波长下使用 72-1 型分光光度计测定光密度(OD)值, 根据标准曲线查找相应还原态的 TTC 含量。

1.6 试验设计 按 $L_{16}(4^2 \times 2^5)$ 正交试验设计, 含水量 33%、26%、20%、14% 共 4 个不同水平梯度; 冷冻方式包括快速冷冻和慢速冷冻; 解冻方式包括快速解冻和慢速解冻; 冷冻保护剂有二甲基亚砷、蔗糖和乙二醇, 质量分数均为 5%、10%、15%、20% 和 5%、10%, 试验设计方案见表 1~2。

表 1 正交试验因素与水平设计

Table 1 The factors and levels design of the orthogonal test

水平 Levels	因素 Factors					
	(A)二甲亚砷 Dimethyl sulfoxide//%	(B)含水量 Moisture content//%	(C)冷冻方式 Freezing method	(D)解冻方式 Thawing method	(E)蔗糖 Sucrose//%	(F)乙二醇 Ethylene glycol//%
1	5	14	快	快	5	5
2	10	20	慢	慢	10	10
3	15	26				
4	26	33				

表 2 L_{16} 正交试验设计

Table 2 The design of L_{16} orthogonal experiment

试验号 Test No.	A	B	C	D	E	F
1	1	1	1	1	1	1
2	1	2	1	1	1	2
3	1	3	2	2	1	2
4	1	4	2	2	2	1
5	2	1	1	2	1	1
6	2	2	1	2	2	2
7	2	3	2	1	1	2
8	2	4	2	1	2	1
9	3	1	2	1	2	2
10	3	2	2	1	1	1
11	3	3	1	2	2	1
12	3	4	1	2	1	2
13	4	1	2	2	2	2
14	4	2	2	2	1	1
15	4	3	1	1	2	1
16	4	4	1	1	1	2

2 结果与分析

2.1 不同含水量对樟树成熟种子超低温保存的影响 细胞结构的完整性是种子活力的基础^[7], 当种子老化劣变时, 细胞膜受到损伤甚至解体, 膜透性增大, 电解质外渗, 水浸液电导率上升^[8], 所以测定的相对含水量越大, 其种子活性越低。脱氢酶是种子呼吸过程中一种重要的还原酶, 其活性与种子的发芽力密切相关^[9], 与种子的呼吸强度呈正相关, 而 OD 值能反映脱氢酶的活性, TTC 含量越高, 种子活性越强。

由表 3 和表 4 可知, 无论是相对电导率测定还是 TTC 含量测定, 其中 B(含水量)的 R 值最大, 含水量对二者的影响极显著, 这说明在种子超低温保存过程中含水量的影响最显著。B2 和 B3 即当种子含水量为 20%~26% 时, 种子经过超低温保存后活性较高。LSD 比较结果表明, B2 和 B3 对结果的影响极显著。综合考虑, 樟树种子超低温保存过程中种子

最佳含水量为 26%。

2.2 不同冷解冻方式对樟树成熟种子超低温保存的影响 表 3 中通过对相对电导率的级差分析发现, 冷解冻方式的 R 值分别为 31.38 和 17.86, 说明冷解冻方式对樟树种子超低温保存相对电导率有极大影响。表 4 中冷冻方式的 R 值为 12.21, $P < 0.05$, 影响达到显著水平, 而解冻方式对结果的影响不显著, 说明仅冷冻方式对樟树种子超低温保存 TTC 含量有较大影响。

表 3 中 C2(即慢冻方式)的超低温保存种子的相对电导率较小, 种子活性较高; 表 4 中慢冻方式的超低温保存过程后 TTC 含量较高, 种子活性较高。表 3 中解冻方式 $K_1 > K_2$, 表明 D2 即慢解冻方式种子经超低温保存后相对电导率较低。综上所述, 最利于种子超低温保存的解冻方式为慢冻和慢解冻。

表 3 樟树种子超低温保存相对电导率测定的极差分析

Table 3 The range analysis of relative electrolytic leakage after cryopreservation in the seed of *C. camphora*

指标 Index	A	B	C	D	E	F
K_1	83.16	154.45	189.56	183.80	170.04	172.36
K_2	94.55	75.17	158.18	165.94	177.70	175.38
K_3	79.11	74.53				
K_4	90.92	90.16				
R	15.44	79.92	31.38	17.86	7.66	3.02

2.3 不同冷冻保护剂对樟树成熟种子超低温保存的影响 通过方差分析发现, 无论测定相对电导率还是 TTC 含量, E 和 F 因素的 P 值均大于 0.05, 所以该试验中冷冻保护剂的蔗糖和乙二醇含量对樟树种子超低温保存的影响不大。A 因素的方差分析 P 值均小于 0.05, 说明 A 因素(二甲亚砷含量)对樟树种子超低温保存的影响显著。

表 3 中 A 因素的 K_3 值最小, 说明 A3 的相对电导率值较低, 通过 LSD 分析发现 A3 和 A2、A4 的 P 值分别为 0.003 和

0.018; A3和A1的 P 值为0.401,影响不显著。这表明二甲基亚砷含量为A1或A3(即5%或15%)时,种子经过超低温保存后活性较高。表4中通过LSD比较发现A3和A1的 P 值为0.023,影响达到显著水平,说明在樟树种子超低温保存过程中A3因素(即15%的二甲基亚砷)比二甲基亚砷含量为5%时能更好地保护种子活性。综合考虑,在樟树种子超低温保存过程中,15%二甲基亚砷是最好的冷冻保护剂。

表4 樟树种子超低温保存TTC含量测定的极差分析

Table 4 The range analysis for the content determination of TTC after cryopreservation in the seed of *C. camphora*

指标 Index	A	B	C	D	E	F
K_1	29.96	68.16	63.15	69.56	67.31	64.38
K_2	41.55	28.32	75.35	68.95	71.19	74.13
K_3	32.06	43.14				
K_4	34.94	23.58				
R	11.59	44.58	12.21	0.61	3.88	9.75

3 讨论

通过正交试验对樟树种子超低温保存后相对电导率和脱氢酶活性(TTC含量)进行测定,结果发现贮藏材料(包括种子和离体胚)的含水量是超低温保存成功与否的关键因素,尤其是在顽拗性种子的超低温保存过程中,适度脱水能在超低温冷冻或解冻过程中避免或减轻低温伤害,是超低温保存成功的关键^[10-12]。冷冻方式和解冻方式的选择则是对超低温保存过程中剧烈降温和升温的控制,是超低温保存的辅助手段。冷冻保护剂在超低温过程中对剧烈温度变化有很好的缓冲作用,但由于冷冻保护剂本身对材料有毒害作用,所以适宜的种类和浓度是冷冻保护剂选择的关键。该研究探讨了樟树种子超低温保存的最佳条件,结果发现适度脱水至含水量为26%时的樟树种子在含15%二甲基亚砷的冷

冻保护剂保护下,经过慢冷冻和慢解冻的方式在超低温保存过程中能最大限度减少细胞损伤,保持种子活性。

目前超低温保存作为一种重要的种子保存技术,具有十分广阔的应用前景。尤其是对顽拗性种子而言,超低温保存因其操作简便、投入少,保存种子遗传稳定、易出现抗寒新品种等优点成为最佳贮藏手段。成功保存顽拗性种子的报道也不断出现^[3,13],但总体来说研究工作尚处于起步阶段,种子超低温保存还存在许多问题有待解决,如保存后的存活率低、正常成苗困难等。

参考文献

- [1] 郭玉琼,赖钟雄,吕柳新. 玻璃化法超低温保存龙眼胚性愈伤组织的初步探讨[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2006, 35(3): 262-265.
- [2] 殷晓辉,舒理慧. 植物种质资源的超低温保存研究进展(综述)[J]. 热带亚热带植物学报, 1996, 4(3): 75-82.
- [3] 李庆荣,郑郁善. 顽拗性种子种质超低温保存研究进展[J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(4): 608-612.
- [4] 陈礼光,陈美德,林国新,等. LN2处理板栗种子和离体胚保存的效果分析[J]. 江西农业大学学报, 2005, 27(6): 890-894.
- [5] 黄学林,陈润政. 种子生理实验手册[M]. 北京:北京大学出版社, 1990: 125-127.
- [6] 张宪政. 作物生理研究法[M]. 北京:农业出版社, 1992.
- [7] 傅家瑞. 种子生理[M]. 北京:科学出版社, 1985.
- [8] 彭幼芬,王文章,胡哲森,等. 种子生理学[M]. 长沙:中南工业大学出版社, 1994.
- [9] 郑郁善,陈礼光,李庆荣,等. 板栗种子超低温保存研究[J]. 林业科学, 2002, 38(6): 146-149.
- [10] RUHL G, DAMBROTH M, BIEHL B. Investigations on the causes of sensitivity to cold and drying of tropical seeds with cocoa as an example. II. Dehydration parameters and exudation of drying cocoa seeds and seed organs[J]. Landbauforschung volkenrode, 1988, 38(3): 235-251.
- [11] PENCE V C. Desiccation and the survival of *Aesculus*, *Castanea* and *Quercus* embryo axes through cryopreservation[J]. Cryobiology, 1992, 29(3): 391-399.
- [12] FU J R, XIA Q H, TANG F. Effects of desiccation on excised embryonic axes of three recalcitrant seeds and studies on cryopreservation[J]. Seed Sci & Technol, 1993, 21: 85-95.
- [13] 唐安军,龙春林. 低温保存技术在顽拗性种子种质保存中的利用[J]. 广西植物, 2007, 27(5): 759-764.
- [14] 孙学成,胡承孝,谭启玲,等. 施用钼肥对冬小麦游离氨基酸、可溶性蛋白质和糖含量的影响[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(1): 40-43.
- [15] HARE P D, CRESS W A, VAN STADEN J. Proline synthesis and degradation: A model system for elucidating stress-related signal transduction[J]. Journal of experimental botany, 1990, 50(333): 413-434.
- [16] 张军,鲁敏,孙树贵,等. 7个冬小麦品种灌浆期抗旱性鉴定指标的综合评价[J]. 植物科学学报, 2014, 32(2): 148-157.
- [17] WU S W, HU C X, TAN Q L, et al. Nitric oxide mediates molybdenum-induced antioxidant defense in wheat under drought stress[J]. Front plant science, 2017, 8: 1085.
- [18] 李善家,韩多红,王恩军,等. 外源甜菜碱对盐胁迫下黑果枸杞种子萌发和幼苗保护酶活性的影响[J]. 草业科学, 2016, 33(4): 674-680.
- [19] SUN X C, HU C X, TAN Q L, et al. Effects of molybdenum on expression of cold-responsive genes in abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways in winter wheat under low-temperature stress[J]. Annals of botany, 2009, 104(2): 345-356.
- [20] GARBERO M, PEDRANZANI H, ZIRULNIK F, et al. Short-term cold stress in two cultivars of *Digitaria eriantha*: Effects on stress-related hormones and antioxidant defense system[J]. Acta physiologiae plantarum, 2011, 33(2): 497-507.
- [21] MA F F, LU R, LIU H Y, et al. Nitric oxide-activated calcium/calmodulin-dependent protein kinase regulates the abscisic acid-induced antioxidant defence in maize[J]. Journal of experimental botany, 2012, 63(13): 4835-4847.

(上接第158页)

- [20] SUN X C, TAN Q L, NIE Z J, et al. Differential expression of proteins in response to molybdenum deficiency in winter wheat leaves under low-temperature stress[J]. Plant molecular biology reporter, 2014, 32(5): 1057-1069.
- [21] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2006: 134-136.
- [22] 常青山,张利霞,米银法,等. 外源ALA对盐胁迫下夏枯草幼苗抗氧化能力与光合特性的影响[J]. 核农学报, 2017, 31(10): 2055-2062.
- [23] 孙德智,杨恒山,彭清,等. 外源SA和NO对NaCl胁迫下番茄幼苗生长、光合及离子分布的影响[J]. 生态学报, 2014, 34(13): 3519-3528.
- [24] 周艳,刘慧英,王松,等. 外源GSH对盐胁迫下番茄幼苗生长及逆境生理指标的影响[J]. 西北植物学报, 2016, 36(3): 515-520.
- [25] MAHAJAN S, TUTEJA N. Cold, salinity and drought stresses: An overview[J]. Archives of biochemistry and biophysics, 2005, 444(2): 139-158.
- [26] 徐建欣,杨浩,刘实忠,等. 干旱胁迫对云南陆稻幼苗生理特性的影响[J]. 中国农学通报, 2014, 30(27): 145-152.
- [27] 张荣梅,马彦军. NaCl胁迫对黑果枸杞叶片生理指标的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2017, 52(4): 110-117.
- [28] 郝媛媛,胡耀文,张文培,等. 荒漠黑果枸杞研究进展[J]. 草业科学, 2016, 33(9): 1835-1845.
- [29] 黄国宾,张晓海,杨双龙,等. 渗透调节参与循环干旱锻炼提高烟草植株抗旱性的形成[J]. 植物生理学报, 2012, 48(5): 465-471.
- [30] 米永伟,陈垣,郭凤霞,等. 盐胁迫下黑果枸杞幼苗对外源甜菜碱的生理响应[J]. 草业科学, 2012, 29(9): 1417-1421.