

米槁成熟种子长期保存研究

吴媛, 吴之坤*

贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳

收稿日期: 2023年3月20日; 录用日期: 2023年4月20日; 发布日期: 2023年4月27日

摘要

研究种质的保存问题, 对濒危植物的保护和种质资源的长期利用尤为重要。方法: 以来自贵州省三个不同种群的米槁成熟种子为研究对象, 对干燥脱水后的种子活力、萌发以及低温保存后的种子活力、萌发进行测试。结果: 刚采集回来的米槁种子直接播种萌发率极低, 但种子活力值高, 将新鲜种子胚轴剥离进行离体萌发, 胚胎体外发芽率最高有95%; 进行干燥脱水后的种子均不能萌发, 但剥离出胚胎后可以萌发; 胚胎体外发芽率随含水量的减少而降低, 当种子脱水至最低含水量时, 胚胎体外发芽率最低为坝布种群12.5%, 最高为巧乱种群65%; 低温保存后解冻恢复48 h的米槁种子进行TTC染色和胚胎体外发芽实验, 结果表明胚胎活力值为0%, 胚胎体外发芽率为0%。结论: 米槁成熟种子的胚胎具有一定的耐脱水性, 但种子不耐脱水; 经干燥脱水后的米槁成熟种子是不能进行低温保存的, 这为米槁种子的长期储存提供了科学依据。

关键词

米槁, 成熟种子, 脱水, 种质资源保存

Study on Long-Term Cryopreservation Preservation with Mature Seeds of *Cinnamomum migao*

Yuan Wu, Zhikun Wu*

School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

Received: Mar. 20th, 2023; accepted: Apr. 20th, 2023; published: Apr. 27th, 2023

Abstract

Research on the conservation of germplasm is particularly important for the protection of endangered

*通讯作者。

plants and the long-term utilization of germplasm. Method: The mature seeds of *Cinnamomum migao* from three different populations in Guizhou Province were studied. Seed viability and germination after drying and dehydration, and the seed viability and germination after cryopreservation were tested. The germination of the freshly collected rice seeds is extremely low, but the seed vitality value is high. The embryo germination rate was up to 95% *in vitro* by peeling off the cotyl of fresh seeds. Seeds cannot germinate after dehydration, but the embryos can germinate. The germination rate of embryos *in vitro* decreases with the decrease of water content. When the seeds were dehydrated to the lowest water content, the embryo germination rate *in vitro* was as low as 12.5% of the Babu population and 65% at the highest in the Qiaoluan population. After thawing, the seed vitality was 0% by determining with TTC method and *in vitro* germination of plumular axis was 0% of *C. migao*. Conclusion: The embryos of mature seeds have a certain degree of resistance to dehydration, but the seeds are not resistant to dehydration. After drying and dehydration, mature seeds cannot be stored at cryopreservation, which provides a scientific basis for the germplasm storage of *C. migao* seeds.

Keywords

Cinnamomum migao, Mature Seed, Dehydration, Germplasm Preservation

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

种子生理学家 HARRINGTON 提出了延长种子保存寿命的双低理论[1], 延长了正常性种子的保存寿命, 因此, 低温低含水量成为保存这类种子的主要方式。而椰子、芒果等热带作物属于顽拗性种子, 由于对低温和干燥的敏感性, 采用低温低含水量的方法却只能加速种子的死亡, 因此目前认为超低温是保存顽拗性种子的最佳手段[1]。

米槁(*Cinnamomum migao*)为樟科樟属的一种常绿乔木, 主要分布在我国云南、广西、和贵州的少数地区[2]。经药理研究表明, 以米槁精油为主要成分的制剂具有抗心肌缺血、镇痛以及扩张冠脉等作用[3][4][5]。由于人类活动范围的扩张、药物研究开发以及香料市场的需求等影响, 导致米槁野生植物种群和数量近年来急剧减少[6], 在对米槁进行野生植物资源调查和遗传研究时发现, 其种群组成主要为成年大树, 野生幼苗极少见, 种群年龄结构严重不合理, 并且随着种群数量的减少以及生长环境的限制, 米槁存在较低的基因流动, 使米槁对环境的适应性降低, 进一步威胁了米槁野生种群的繁衍[7][8][9]。2013年, 米槁在世界自然保护联盟红色名录中被列为近危(NT)等级, 在《中国生物多样性红色名录·高等植物卷》列为濒危物种(中国珍稀濒危植物信息系统(iplant.cn))。在笔者的前期调查和文献查阅中发现, 米槁还存在坐果率低、果实有大年小年、种子萌发困难以及不能进行常规的长期保存等因素限制了米槁自然繁育的情况。前期已经有相关的报道对米槁成熟种子的保存做了研究, 结果表明米槁的成熟种子在常规保存下很快失活, 比较适合米槁保存的方法为低温沙藏, 但在保存 7 个月后, 种子活力显著降低[10]。笔者以米槁的成熟种子为实验材料, 对来自贵州三个种群的米槁成熟种子进行了干燥脱水的萌发实验、种子低温和超低温长期保存实验研究, 以期对米槁的种子长期保存提供理论基础。

2. 实验材料、试剂和仪器

2.1. 实验材料收集

实验材料采集于贵州省的三个野生米槁种群成熟种子。运送至实验室后, 用手将种子从果皮中取出,

并在流动的水下搓洗除去褐色的肉质果皮, 并将种子表面的多余水分吸干。米槁成熟种子具体来源见表 1。

Table 1. Geographical overview about the population of *C. migao* mature seeds

表 1. 米槁成熟种子来源种群的地理概况

种源	经度/E	纬度/N	海拔/m
册亨县板纳	105°43'3.48"	24°59'31.27"	980.00
望谟县巧乱	106°16'17.34"	25°4'45.07"	805.00
册亨县坝布	106°1'52.90"	25°0'18.35"	482.00

2.2. 试剂和仪器

WPM 培养基母液试剂; 细胞分裂素(6-BA, 6-Benzylamino Purine); 赤霉素(gibberellins); 植物凝胶(Phytigel); 琼脂; TTC (triphenyltetrazolium chloride); 蔗糖; 活性炭(active carbon, AC); 二氯异氰尿酸钠溶(Sodium Dichloroisocyanurate, NaDCC); 75%乙醇; 无菌水。

超净工作台; 高压灭菌锅; 三角瓶; 培养皿; 组培瓶; 镊子; 无菌手术刀; 酒精灯; 无菌滤纸; 体视显微镜; 烘箱; 电子天平; 双十五干燥间。

3. 实验方法

3.1. 干燥和储存

所有实验操作均在常温常压下进行。

在 103℃ 下连续干燥 17 小时后, 通过重量法测定随机选择的 10 粒种子的初始含水量(ISTA, 1996)。种子的干燥是在相对湿度为 15%、温度为 15℃ 的室内进行。基于已经测定的种子的重量和初始含水量, 将种子干燥至 15%、10% 和 5% 三个目标含水量。通过每 2 小时监测样品重量的减少来确定达到目标含水量时样品的重量, 当样品重量达到目标含水量时的重量时, 通过用于初始含水量测定的方法来测定样品的实际含水量。

将干燥至目标含水量的种子播种用于发芽, 并将胚胎切除用于 TTC 活力测定和体外发芽。干燥后的种子装入密封罐内放入 -20℃ 的种子库内储存, 投入液氮储存的种子则装入冷冻管内后直接投入液氮内, 种子均在 -20℃ 种子库和液氮库内储存 3 个月。然后将冷冻保存的种子取出, 在切除胚胎前, 放置于室温下, 在密闭容器内进行水上吸水 48 h, 将其胚胎切除用于 TTC 活力测定和体外发芽。

3.2. 发芽实验

对于新鲜成熟的种子, 将 20 粒种子放在含有 200 mg/L 赤霉素(GA3)的 1% 琼脂 - 水的 90 mm 培养基中, 三次重复。让后放置在 25/15℃, 光照时间为每天 12 小时, 黑暗 12 小时。将干燥至含水量 15%、10% 和 5% 的种子以及储存了 3 个月的种子在解冻后也进行上述试验, 并对干燥后以及储存的种子还进行了 TTC 活力测定试验。发芽试验进行 12 周, 连续两周没有种子发芽则终止试验。在终止试验后, 将未发芽的种子切开, 来确定未发芽的种子是空的、还是腐烂的。

3.3. 离体胚胎的体外发芽试验

将种子外果皮搓洗干净, 并用自来水将种子清洗至种皮上无果皮附着物为止, 吸干种皮表面水分, 先用 1% 二氯异氰尿酸钠二水合物溶液浸泡种子, 消毒 2 小时。随后将种子转移至洁净工作台, 将对种子消毒的 1% 二氯异氰尿酸钠二水合物溶液倒出, 倒入约种子体积 2 倍的 75% 乙醇消毒 5 min。消毒结束后用 5% NaDCC 溶液浸泡 20 min。再用无菌水清洗三次后将种子放置在培养皿内备用。消毒结束的米

稿种子用手术刀和镊子将种皮剥开去除胚胎放置在培养基上, 25℃, 黑暗条件。胚胎发芽培养基见表 2。

Table 2. The medium formulation of *C. migao* maturation embryo germination
表 2. 米槁成熟胚胎发芽培养基配方

试剂名称	用量 mg/L
6-BA	0.2
GA3	1.0
植物凝胶	3000
蔗糖	3×10^4
活性炭	1000

计算和统计分析:

初始含水量根据新鲜重量确定为: ① $MC(\text{含水量}) = (FW - DW)/FW \times 100\%$ 。FW 是种子的鲜重; DW 是种子干重[11]。

② $GP(\text{发芽率}) = (N - Ni)/N$ 。N 是测试发芽种子的总数; Ni 是发芽的种子数[11]。

③ $GPe(\text{胚胎发芽率}) = Ng/(Nt - Nc) \times 100\%$ 。Ng 是发芽的胚胎数量; Nt 是切除用于发芽的总数量; Nc 是被污染的胚胎数量[11]。

3.4. 数据统计

所有数据均采用 Excel 10.0 计算和整理。

4. 结果与分析

4.1. 米槁种子含水量、活力测定和萌发结果分析

从表 3 可知, 从种源地取回来的米槁种子其活力值较高, 种子活力均大于 80.00%, 活力值最高的种子来源于板纳, 为 100.00%, 种子活力最低的来源于坝布, 为 85.00%。不同来源的米槁成熟种子在脱水后仍保持较高的活力。当脱水至含水量为 15%时, 最高活力值为 88.67% (板纳), 最低活力值为 84.21% (坝布)。随米槁种子含水量的减少, 当脱水至目标含水量(5.00%)时, 种子活力值最低为 50.00% (巧乱), 活力值最高的种子为坝布(68.42%)。

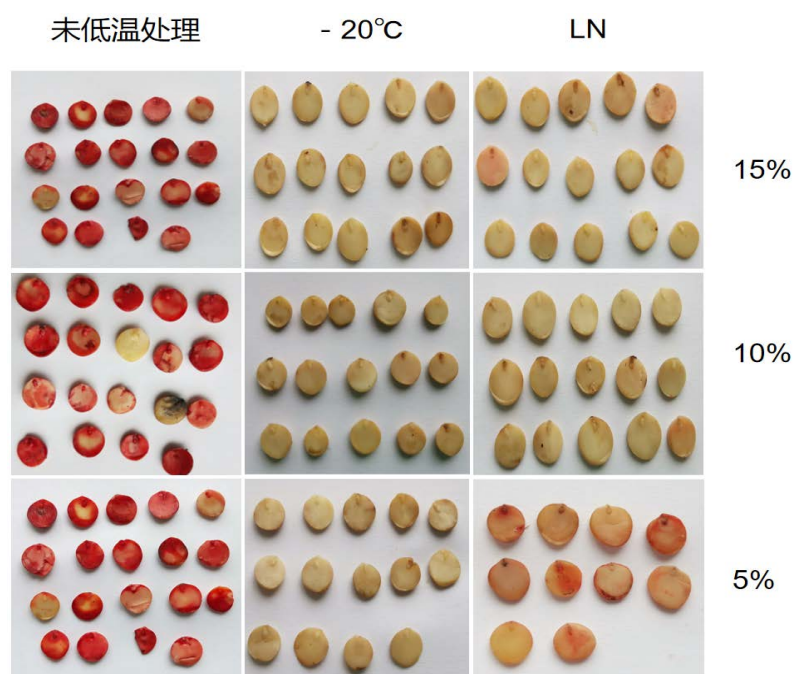
采收回来的种子, 除去果皮后直接放置在萌发培养基上进行萌发实验, 发芽率极低, 最高仅为 2.22%, 而来自坝布的米槁种子未观察到发芽, 在观察到发芽的种子中发芽时间也较晚, 在培养基上放置 6 W 后才开始发芽。而进行脱水处理后的米槁成熟种子, 所有种源的种子均未观察到发芽。

采收回来的米槁成熟种子在胚轴的离体萌发实验中, 具有很高的萌发率, 最高萌发率来源于板纳采集的种子为 95.00%, 三个种源地的萌发率均大于 80.00%。随着种子含水量的降低, 萌发率逐渐下降, 当脱水至目标含水量为 15.00%和 10.00%时, 板纳和巧乱采集的种子胚轴离体萌发率均大于 70.00%, 来源于坝布的种子离体萌发率则明显降低仅为 28.57%和 10.34%。当脱水至目标含水量为 5%时, 坝布和板纳两个种群的胚胎发芽率仍保持大于 50.00%的水平, 而坝布的种子胚轴离体萌发率为 12.50%。从表 3 可以看出, 当米槁成熟种子脱水至一定程度时, 不能对其进行种子萌发, 但可以将胚轴取出, 在无菌条件下进行离体培养, 并且在脱水后的米槁种子进行胚轴活力测定时, 胚轴保持较高的活力值, 说明米槁种子胚轴具有一定的耐脱水性, 而米槁种子的子叶则在脱水后死亡, 并且坚硬的种皮也可能是阻碍种子萌发的原因。

Table 3. The viability value, water content, seed germination and *ex vivo* germination rate of mature seeds from different population**表 3.** 不同来源的米槁成熟种子不同含水量的活力值、种子发芽率和离体萌发率

种源	目标含水量% (实际含水量%)	干燥后活力值%	种子萌发率%	胚胎发芽率%
板纳	CK	100.00	1.33	95.00
	15 (16.61)	88.74	0	77.78
	10 (11.32)	81.80	0	71.07
	5 (6.87)	64.58	0	56.82
巧乱	CK	95.00	2.22	81.05
	15 (11.35)	93.75	0	73.07
	10 (8.08)	86.67	0	71.43
	5 (5.29)	50.00	0	65.00
坝布	CK	85.00	0	80.00
	15 (15.33)	84.21	0	28.57
	10 (10.17)	72.22	0	10.34
	5 (8.16)	68.42	0	12.5

4.2. 米槁种子长期保存活力测定和萌发结果

**Figure 1.** TTC staining results of *C. migao* seeds after cryopreservation**图 1.** 米槁种子在经长期冻存后的 TTC 染色结果

根据 3.1 的结果米槁种子干燥脱水后的种子萌发率(0%), 经低温和超低温保存的种子不进行萌发实验, 仅对其进行种子活力测定和胚轴的离体萌发实验。TTC 染色结果见图 1。根据染色结果可知, 不同含水量的米槁成熟种子在经-20°C 和液氮(Liquid Nitrogen, LN)进行长期低温保存后, 无论是子叶还是胚轴均不能被 TTC 染成鲜红色, 表明种子生活力很差, 通过离体萌发试验发现, 经长期低温冻存的胚轴均未能萌发, 说明米槁成熟种子在经低温冻存后, 其胚轴已经死亡。

5. 讨论

5.1. 脱水对成熟种子活力值和萌发的影响

大量研究表明,成熟种子在经历一定程度的脱水后,种子依然保持较高的活力并能成功萌发[11][12]。虽然米槁种子含水量低至 5.29%时仍保持着 50%的活力,但对其进行萌发试验结果表明,经脱水后的种子完全不能萌发,这可能与米槁成熟种子具有生理休眠有关。黄小龙对米槁种子的萌发障碍进行研究表明,米槁成熟种子具备完备的种胚结构,不具备形态休眠;内果皮具备吸水透气作用,不存在物理休眠;但存在由于内源抑制物引起的生理休眠,主要与一些可以溶于有机溶剂的酚类、醚类、醛类等有机物有关,且米槁种子的内果皮和种胚均含有不同含量的内源抑制物[13]。本研究中对米槁成熟种子进行脱水处理后,提高了单位内米槁种子有机内源抑制物的含量,并且坚硬的种皮也是阻碍萌发的原因之一[10],导致了米槁种子脱水处理后不能进行种子萌发,而取出胚轴后萌发不受影响。

5.2. 低温长期保存在种子保存的作用

对拟南芥茎尖进行超低温保存的研究表明,细胞在液氮的超低温环境下会停止新陈代谢,从理论上说细胞的生活力和形态会保持稳定不变[14]。目前,超低温保存作为种质资源长期保存最理想的途径,以种子为保存材料,已经在经济作物[15][16]、观赏植物、中药材[17]和林木[18][19]上取得研究成果。含水量是种子进行低温贮藏成功与否的一个关键因素,在对不同含水量的花生种子进行低温贮藏试验表明,含水量 > 15%则会丧失生活力[20],米槁成熟种子在常温贮藏 3 个月,种子活力显著降低,即使采用沙藏的方式,种子在 7 个月 after 活力也显著下降[10],本研究试验结果表明,米槁成熟种子即使脱水至一定程度,胚轴具有活力,但在低温保存后活力丧失,离体萌发试验也未观察到发芽的胚轴,表明米槁成熟种子具有一定的耐脱水性,而不耐低温贮藏。对同属植物樟树进行的试验结果也表明,种子具有一定的脱水耐性,但不耐 0℃以下低温保存[21]。

6. 结论

本研究以米槁的成熟种子为研究对象,结果表明了米槁成熟种子是不能作为材料直接进行超低温保存的,但是目前超低温保存的技术已经逐渐成熟,在多种植物上取得成功,且用于超低温保存的材料除了种子以外,胚性愈伤组织和悬浮细胞、茎尖类的分生组织以及花粉等均在多种植物上取得成功[22][23][24]。因此,对米槁种质资源的长期保存还可以对除种子以外的材料进一步研究。

基金项目

国家自然科学基金委员会 - 贵州省人民政府联合基金项目(U1812403-2)。

参考文献

- [1] 尹广鹏, 辛霞, 张金梅, 等. 种质库种质安全保存理论研究的进展与展望[J]. 中国农业科学, 2022, 55(7): 1263-1270.
- [2] 赵山, 李鸿玉, 邱德文, 等. 大果木姜子资源, 生态调查——贵州、桂北及湘黔桂接壤区[J]. 贵阳中医学院学报, 1991(3): 59-61, 35.
- [3] 李亚辉, 杨欣. 贵州大果木姜子对急性心肌缺血损伤的保护作用[J]. 中医药信息, 2020, 37(3): 4-8.
- [4] 刘同祥, 刘庆山, 申刚义, 等. 大果木姜子镇痛作用活性部位筛选[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(8): 550-554.
- [5] 钱斌, 李江. 苗药大果木姜子口服乳剂和静脉乳剂对大鼠实验性心肌缺血的保护作用[J]. 贵阳中医学院学报, 2009, 31(3): 43-45.

- [6] 师红毅, 师琴丽, 王特文, 等. 贵州独特的苗族药用植物——米槁[C]//中国民族医药学会. 2003 全国苗医药学术研讨会特辑: 2003 年卷. 贵阳: 贵阳中医学院学报编辑部, 2003: 76-78.
- [7] 李丽霞. 贵州省米槁种群特征研究[D]: [硕士学位论文]. 贵阳: 贵州大学, 2017.
- [8] 李丽霞, 刘济明, 黄小龙, 等. 米槁天然种群遗传多样性的 ISSR 标记分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2018, 46(7): 15-22.
- [9] 陈美兰, 周涛, 江维克, 等. 苗药大果木姜子的遗传分化及其化学变异的相关性分析[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(11): 1409-1415.
- [10] 高攀, 刘济明, 李丽霞, 等. 米槁种子生物学特性研究[J]. 广东农业科学, 2015, 42(22): 23-27.
- [11] Lin, L., Cai, L., Fan, L., *et al.* (2022) Seed Dormancy, Germination and Storage Behavior of *Magnolia sinica*, a Plant Species With Extremely Small Populations of Magnoliaceae. *Plant Diversity*, **44**, 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2021.06.009>
- [12] 晋凡生, 张彦琴, 梁改梅, 等. 贮藏温度和含水量对党参种子活力的影响[J]. 种子, 2020, 39(7): 6-11.
- [13] 黄小龙. 米槁种子萌发障碍研究[D]: [博士学位论文]. 贵阳: 贵州大学, 2020.
- [14] Basu, C. (2008) Gene Amplification from Cryopreserved *Arabidopsis thaliana* Shoot Tips. *Current Issues in Molecular Biology*, **10**, 55-60.
- [15] 赵丹琦, 宋江萍, 贾会霞, 等. 葱韭类蔬菜种质资源种子超低温保存技术研究[J]. 植物遗传资源学报, 2022, 23(5): 1258-1268.
- [16] 王婷婷, 杨建宇, 张文明, 等. 液氮超低温贮藏对玉米种子活力的影响[J]. 种子, 2014, 33(12): 30-32, 36.
- [17] 何明高, 王瑞霞, 宋希强, 等. 束花石斛种子超低温保存的研究[J]. 云南植物研究, 2010, 32(4): 334-338.
- [18] 张晓宁, 张焯, 肖玉菲, 等. 含水量对超低温保存后马尾松种子生理生化特性的影响[J]. 种子, 2020, 39(8): 48-51.
- [19] Entensa, Y, González-Morales, A., Linares, C., *et al.* (2022) Cryopreservation of Seeds of the Highly Valued Tropical Timber Species *Swietenia Mahagoni*. *Cryoletters*, **43**, 341-348. <https://doi.org/10.54680/fr22610110412>
- [20] 林煜春. 花生种子不同含水量低温贮藏对其种子活力及幼苗的影响[J]. 农业开发与装备, 2020(9): 148-149.
- [21] 田春娥, 姜孝成. 樟树种子的脱水耐性和贮藏特性研究[J]. 种子, 2009, 28(9): 19-23.
- [22] 姜忠国, 董丹, 张琪, 等. 玉蝉花花粉生活力检测和超低温保存研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(1): 216-219, 222.
- [23] 董婉琦, 张延红, 何春雨, 唐顺莉. 黄芩休眠芽茎尖玻璃化超低温保存研究[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(6): 1463-1466.
- [24] 陈勇, 王君晖, 黄纯农. 胡萝卜悬浮培养细胞和原生质体的玻璃化超低温保存[J]. 浙江大学学报(理学版), 2002, 29(1): 94-98.