

刺槐种子超低温保存研究

翟晓巧¹, 程斐² (1.河南省林木种质资源保护与良种选育重点实验室, 河南郑州 450008; 2.河南农业大学, 河南郑州 450002)

摘要 [目的]为实现刺槐种质资源超低温保存提供理论和实践依据。[方法]研究了刺槐种子的含水量、不同化冻方式及不同程度的机械撞击对超低温保存后刺槐种子的发芽率、电导率和脱氢酶活性的影响。[结果]当刺槐种子的含水量从 7.1% 增加到 9.1%, 发芽率和 TTCH 含量明显降低, 而电导率上升。这说明在保持种子活力的前提下, 低含水量有利于刺槐种子的超低温保存。对于超低温保存后的刺槐种子, 40℃ 温水化冻比慢速室温解冻更为适宜。机械撞击对处于超低温保存下的刺槐种子有一定的影响, 故应尽量避免剧烈震动。[结论]含水量对超低温保存后刺槐种子的发芽率影响显著。40℃ 温水化冻 5 min 的化冻方式对超低温保存后刺槐种子的活力影响较小, 种子发芽率较高。

关键词 刺槐种子; 超低温保存; 种子活力

中图分类号 S687.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)02-00524-02

Study on the Cryopreservation of Robinia pseudoacacia Seeds

ZHAI Xiao-qiao et al (Key Laboratory of Forest Germplasm Resources Protection and Improved Variety Breeding of Henan Province, Zhengzhou, Henan 450008)

Abstract [Objective] The research aimed to provide theoretical and practical basis for realizing the cryopreservation of Robinia pseudoacacia germplasm resources. [Method] The effects of water content in the seeds of *R. pseudoacacia*, different thawing ways and mechanical impact with different degree on the germination rate, electrical conductivity and dehydrogenase activity in the seeds of *R. pseudoacacia* after cryopreservation were studied. [Result] When water content in the seeds of *R. pseudoacacia* was increased from 7.1% to 9.1%, the germination rate and TTCH content were obviously decreased, while the electrical conductivity was increased, which indicated that on the premise of keeping seed vigor, low water content was favorable for the cryopreservation of *R. pseudoacacia* seeds. For the seeds of *R. pseudoacacia* after cryopreservation, defrosting with 40℃ warm water was more favorable than slow thawing at room temperature. Mechanical impact had certain effects on *R. pseudoacacia* seeds under the conditions of cryopreservation, so strenuous vibration should be avoided if possible. [Conclusion] Water content had significant effects on the germination rate of *R. pseudoacacia* seeds after cryopreservation. The thawing way of defrosting with 40℃ warm water for 5 min had little effect on the seed vigor of *R. pseudoacacia* seeds after cryopreservation and the germination rate of seeds was higher.

Key words Robinia pseudoacacia seeds; Cryopreservation; Seed vigor

超低温保存通常是指在 -80°C (干冰温度)到 -196°C (液氮温度)下保存生物材料的方法。由于其具有在保存生物材料活力的前提下降低甚至完全抑制生物材料新陈代谢及基因变异的可能性, 能够保持生物材料的遗传稳定性, 是目前植物资源长期保存方式中较为理想的方法^[1-3]。目前, 已针对多个木本植物树种进行了超低温保存研究^[4-6]。刺槐(*Robinia pseudoacacia* L.) 为重要的用材树种, 刺槐种子常温下保存活力下降较快。因此, 研究保护刺槐种子活力, 探讨刺槐种质资源的超低温保存具有十分重要的理论和现实意义。但目前对刺槐种子进行超低温保存的相关研究还未见报道。为此, 笔者研究了超低温保存的一系列因素对刺槐种子萌发率、质膜透性以及活力的影响, 旨在为刺槐种子超低温保存提供理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 材料 供试刺槐种子为从河南省栾川县林木种子站购买的 2006 年秋季新种子, 千粒重 19.2 g。

1.2 方法

1.2.1 含水量对刺槐种子发芽率及活力指标的影响。分别采用先浸泡 1 h、浸泡 4 h 和自然晾干的刺槐种子, 将 3 种状态的种子一部分进行含水量测定, 剩余种子分别密封于冷冻管中, 管盖拧紧, 防止由于温度急剧变化导致热胀冷缩使得外部气体液体进入冷冻管内。冷冻管用铁丝绑附足够配重的螺丝, 并配上将冷冻管从液氮罐内提拉出来的线绳, 直接投入装有液氮的液氮罐中保存, 线绳末端粘附该组

种子编号便于辨识。在液氮中冷冻处理 3 h 后取出, 分别在 40℃ 温水浴中化冻 5 min 进行种子发芽试验, 测定种子含水量、发芽率、脱氢酶活性和电导率。种子含水量根据《国际种子检验规程》(ISTA 编, 1999) 测定, 种子发芽率参照《国际种子检验规程》测定, 脱氢酶活性测定采用 TTC 染色法, 种子电导率测定参照《种子生理实验手册》^[7]。

1.2.2 化冻方式对刺槐种子发芽率及活力指标的影响。将自然风干的刺槐种子采用 1.2.1 中的方法装入冷冻管中, 直接将冷冻管投入到液氮中, 分别在液氮中保存 0.5、1.0、3.0 h 后取出, 分别投入 40℃ 温水浴 5 min 和直接放置在室温(20℃)环境中解冻 15 min。化冻后的种子进行发芽试验。测定种子含水量、发芽率、脱氢酶活性和电导率。

1.2.3 机械撞击对刺槐种子发芽率及活力指标的影响。将自然风干的刺槐种子, 一部分冷冻处理 0.5 h 后从离地 1 m 的高处自由落体 10 次, 另一部分直接冷冻处理 0.5 h 后分别采用 18℃ 室温化冻 15 min 和 40℃ 温水浴中化冻 5 min 进行处理。化冻后的种子进行发芽试验, 测定种子含水量、发芽率、脱氢酶活性和电导率。

2 结果与分析

2.1 含水量对超低温保存下刺槐种子发芽率及活力指标的影响 (表 1) 由表 1 可知, 自然风干的种子含水量为 7.1%, 种子浸泡 1.0 h 后含水量上升为 7.8%, 浸泡 4 h 后种子含水量上升为 9.1%。3 种含水量的种子在液氮中处理 3.0 h 后发芽率、电导率和脱氢酶活性发生了较大的变化, 含水量最高 9.1% 的种子发芽率最低, 为 58.3%, 与风干种子 81.3% 发芽率相比有明显的下降, 刺槐种子含水量从 7.1% 上升为 9.1% 时电导率从 $130.6\mu\text{S}(\text{cm}\cdot\text{g})$ 上升为 $224.3\mu\text{S}(\text{cm}\cdot\text{g})$,

基金项目 林业科技支撑计划专题 (2006BAD01A1601)。

作者简介 翟晓巧 (1971-), 女, 河南宜阳人, 高级工程师, 从事林木生物技术育种工作。

收稿日期 2007-09-10

TTCH 含量从 2.96 $\mu\text{g/ml}$ 下降为 2.14 $\mu\text{g/ml}$, 表现出种子的含水量与发芽率和脱氢酶活性呈正相关, 与电导率呈负相关。

表 1 含水量对超低温保存下刺槐种子发芽率及活力指标的影响
Table 1 Effect of water content on germination rate and vigor index of locust seed under cryopreservation

处理方式 Treatment mode	含水量//% Water content	发芽率//% Germination rate	电导率 $\mu\text{s}(\text{cm}\cdot\text{g})$ Conductivity	TTCH 含量 $\mu\text{g/ml}$ TTCH content
浸泡 1 h	7.8	61.3	170.2	2.48
浸泡 4 h	9.1	58.3	224.3	2.14
风干种子	7.1	81.3	130.6	2.96

2.2 化冻方式对超低温保存下刺槐种子发芽率及活力指标的影响(表 2) 由表 2 可知, 刺槐种子在超低温保存采用 40 $^{\circ}\text{C}$ 快速化冻后, 在液氮中保存 0.5、1.0、3.0 h 后种子的发芽率均稍高于慢速室温解冻的方法, 电导率和脱氢酶活性在 0.5、1.0 h 时表现出 40 $^{\circ}\text{C}$ 快速化冻的电导率低于慢速室温解冻的电导率, 而脱氢酶活性高于慢速室温解冻。因此, 刺槐种子在进行液氮超低温保存时 2 种解冻方式均可以采用, 但由于 40 $^{\circ}\text{C}$ 温水化冻操作更易于控制, 自然室温化冻容易受季节变化的影响, 故认为 40 $^{\circ}\text{C}$ 温水化冻为更适宜的化冻方式。

表 2 化冻方式对超低温保存下刺槐种子发芽率及活力指标的影响
Table 2 Effect of melting mode on germination rate and vigor index of locust seed under cryopreservation

化冻方式 Melting mode	发芽率//% Germination rate	电导率 $\mu\text{s}(\text{cm}\cdot\text{g})$ Conductivity	TTCH 含量 $\mu\text{g/ml}$ TTCH content
0.5 h+18 $^{\circ}\text{C}$	80.3	111.7	2.85
1.0 h+18 $^{\circ}\text{C}$	78.3	140.4	2.87
3.0 h+18 $^{\circ}\text{C}$	79.3	127.5	2.95
0.5 h+40 $^{\circ}\text{C}$	81.7	107.2	3.06
1.0 h+40 $^{\circ}\text{C}$	85.7	126.0	2.90
3.0 h+40 $^{\circ}\text{C}$	81.3	130.6	2.96

2.3 机械撞击对超低温保存下刺槐种子发芽率及活力指标的影响(表 3) 由表 3 可知, 机械撞击和正常处理的种子相比, 发芽率降低, 但 TTCH 含量差异不明显。可能是由于机械撞击的作用, 处于低温下的刺槐种子有约 5% 被震碎, 被震碎的种子虽然无法发芽, 但其组织内部的活力并未受到大的影响, 所以当浸泡于 TTC 溶液中时仍然可以进

(上接第 439 页)

- [2] HASS C G, TANG S, LEONARD S, et al. Three non-allelic epistatically interacting methyltransferase mutations produce novel tocopherol (vitamin E) profiles in sunflower [J]. *Theor Appl Genet*, 2006, 113 (5): 767-782.
- [3] 尤新. 天然维生素 E 的功能和开发前景[J]. *食品工业科技*, 2000, 21 (4): 5-6.

表 3 机械撞击对于超低温保存下刺槐种子发芽率及活力指标的影响
Table 3 Effect of mechanical collision on germination rate and vigor index of locust seed under cryopreservation

处理方式 Treatment approach	发芽率//% Germination rate	电导率 $\mu\text{s}(\text{cm}\cdot\text{g})$ Conductivity	TTCH 含量 $\mu\text{g/ml}$ TTCH content
0.5 h+撞击 10 次+18 $^{\circ}\text{C}$ 0.5 h+hitting 10 times +18 $^{\circ}\text{C}$	72.0	150.7	2.93
0.5 h+撞击 10 次+40 $^{\circ}\text{C}$ 0.5 h+hitting 10 times +40 $^{\circ}\text{C}$	69.0	167.5	3.00
0.5 h+18 $^{\circ}\text{C}$	80.3	111.7	2.85
0.5 h+40 $^{\circ}\text{C}$	81.7	107.2	3.06

行反应的缘故。从电导率来看, 受机械撞击和未受机械撞击差异较大, 应当是由于约 5% 被震碎的种子释放出较多的可溶性物质和电解质所致。从发芽率来看, 机械撞击对处于超低温保存下的刺槐种子有一定的影响, 处于超低温保存下的刺槐种子应尽量避免剧烈震动。

3 结论与讨论

(1) 刺槐种子的含水量对刺槐进行超低温保存后种子的发芽率影响显著, 适度较低的含水量有利于刺槐种子的超低温保存。

(2) 超低温保存的刺槐种子采用 40 $^{\circ}\text{C}$ 温水浴中化冻 5 min 的化冻方式种子活力受到的影响较小, 会获得较高的发芽率。

(3) 机械撞击对处于超低温保存下的刺槐种子有一定的影响, 因此, 处于超低温保存下的刺槐种子应尽量避免剧烈震动。

参考文献

- [1] 徐刚标, 陈良昌. 植物种质超低温保存[J]. *经济林研究*, 1998, 16 (2): 51-53.
- [2] 吴雪梅, 汤浩茹. 包埋玻璃化法超低温保存植物种质的研究进展[J]. *植物学通报*, 2005, 22 (2): 238-245.
- [3] 郭玉琼, 赖钟雄. 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*, 2006, 35 (3): 262-265.
- [4] 李嘉瑞, 郭延平. 猕猴桃愈伤组织的超低温保存[J]. *果树科学*, 1996, 13 (2): 88-91.
- [5] 郑郁善, 陈礼光. 板栗种子超低温保存研究[J]. *林业科学*, 2002, 38 (6): 146-149.
- [6] 陈礼光, 郑郁善. 闽粤栲种子和离体胚超低温保存效果研究[J]. *江西农业大学学报*, 2000, 22 (4): 571-575.
- [7] 黄学林, 陈润政. 种子生理试验手册[M]. 北京: 农业出版社, 1990.
- [4] 胡英考. 植物维生素 E 合成及其生物技术改良[J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24 (1): 32-35.
- [5] 欧阳青, 蔡文启. 天然维生素 E 的生物合成途径[J]. *植物生理学通讯*, 2003, 39 (5): 501-507.
- [6] HOFIUS D, SONNEWALD U. Vitamin E biosynthesis: biochemistry meets cell biology[J]. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 6-8.