

芒果离体胚轴的脱水及贮藏研究

王晓峰¹ 傅家瑞²

(1 华南农业大学农业生物系, 广州, 510642; 2 中山大学生命科学院)

摘要 芒果种子离体胚轴的耐脱水力大于其整粒种子的耐脱水力, 经硅胶脱水至 11% 含水量时仍有 70% 发芽率。5% ~ 10% 的蔗糖和脯氨酸预处理可在一定程度上提高芒果离体胚轴的耐脱水力, 但效果不显著。含水量为 8.7% ~ 38.6% 的干燥离体胚轴经液氮(-196 ℃)贮藏 24 h 后, 生活力完全丧失。

关键词 芒果种子; 离体胚轴; 脱水; 超低温保存

中图分类号 Q945.66

自然界中的种子可分为正常性种子(Orthodox Seeds)和顽拗性种子(Recalcitrant Seeds)两大类(Roberts, 1973)。与正常性种子不同, 顽拗性种子脱落时含水量很高(40% ~ 60%), 脱落后也不耐脱水, 当含水量下降至某一较高水平以下时, 生活力迅速丧失, 寿命非常短暂。由于含水量高, 顽拗性种子除对零下低温敏感外, 对零上低温也较敏感。因此, 传统的、适用于正常性种子的干燥低温贮藏方法已不能应用于顽拗性种子的贮藏。目前, 人们只能采用在相对较低温度中保湿的方法来贮藏顽拗性种子, 但由于湿度大, 温度亦相对较高, 种子易长菌发霉, 而且在贮藏中易提前萌发, 所以只能进行短期(几周~ 几个月)贮藏(Roberts 等, 1980), 达不到保存遗传资源的目的。

近来, 一些研究者(Fu 等, 1990; Normah 等, 1986; Pritchard 等, 1986)发现, 虽然顽拗性种子的整粒种子不耐脱水, 但其离体胚轴却可以干燥至较低含水量水平而适于液氮(LN₂)保存, 为顽拗性种子遗传资源的保存带来了希望。

芒果(*Mangifera indica*)种子是典型的顽拗性种子, 报道的最长贮藏期仍不超过 1 年(王晓峰等, 1991)。本文报道芒果离体胚轴经不同处理后耐脱水力的变化以及运用超低温(-196 ℃)保存芒果离体干燥胚轴的初步结果。

1 材料与方法

1.1 试验材料

所试芒果品种为海南“本地”芒果及象牙芒果, 购自昌江县石碌水库果场, 果实运抵实验室后才取出种子供试验。

1.2 离体胚轴的分离方法

将种子用 0.1%HgCl₂ 消毒 10 min, 然后用无菌水冲洗 3 次, 于超净工作台上剥出胚轴。为了剥取时不伤害胚轴以及体外培养时易于成苗, 离体胚轴带有少量子叶。

1993-07-21 收稿

*国家自然科学基金资助项目

1.3 离体胚轴的干燥方法

1.3.1 硅胶脱水 将无菌的离体胚轴置于经 70% 酒精擦洗和紫外线消毒 20 min 的干燥器 (d 18 cm, 内置 500 g 变色硅胶, 离体胚轴放于两层滤纸上) 中。

1.3.2 超净工作台吹风脱水 将无菌离体胚轴置于一培养皿上, 放在超净工作台面利用超净工作台气流对离体胚轴进行脱水。

1.4 离体胚轴生活力的测定方法

1.4.1 发芽率测定 将离体胚轴接种至 WPM 基本培养基, 外加 500 mg/L 谷氨酰胺, 300 mg/L 水解酪蛋白, 0.5% 活性炭, 1 mg/L NAA 和 ZT, pH5.8 的培养基上, 在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 光照 12 h, 光强 1000 ~ 2000 lx 条件下培养, 一定时间后测定发芽率以及根和芽的长度。

1.4.2 TTC 染色法 将离体胚轴用 0.5% TTC 染色 3 h, 染成红色者呈正反应 (+), 表明具有生活力; 未染成红色者呈负反应 (-), 表明已丧失生活力。

2 结果及讨论

2.1 离体胚轴的脱水

2.1.1 不同干燥方法的效果 芒果种子离体胚轴经硅胶脱水 4 h, 含水量从 70% 下降至 30% 时, 发芽率仍保持 100%, 但根和芽的生长速度下降, 表明这一阶段的脱水虽然对发芽率未造成影响, 但已导致离体胚轴活力的降低。随后随含水量继续降低, 发芽率逐渐下降, 至脱水 9 h, 含水量下降至 11% 时仍有 70% 发芽率, 但根和芽的生长已严重受阻 (表 1)。

表 1 芒果种子离体胚轴经硅胶脱水不同时间后, 于培养基上培养 20 天的情况

脱水时间 /h	含水量 /%	发芽率 /%	根长 /cm	芽长 /cm
0	70	100	3.5	1.7
2	54	100	3.0	1.2
4	30	100	1.3	0.6
5	20	90	1.0	0.4
6	17	80	0.8	0.3
7	15	70	0.3	0.2
8	12	70	0.3	0.1
9	11	70	0.3	0.1

本文亦尝试利用超净工作台气流对芒果离体胚轴进行脱水, 结果发现, 超净工作台吹风脱水的效果与硅胶脱水的效果相差不大, 只是脱水速度较快些, 脱水 6 h 含水量已降至 12%, 但对胚轴伤害亦较严重, 含水量降至 21% 以下时发芽率已开始降低。因此, 2 种方法中以硅胶脱水效果较好。

我们 (王晓峰等, 1991) 以前的研究发现, 当芒果整粒种子的含水量从 69% 下降至 34% 时, 发芽率已从 100% 降至 0, 生活力完全消失。而本文结果表明, 芒果种子的离体胚轴干燥至 11% 的含水量时仍有 70% 发芽率。这说明芒果种子离体胚轴的耐脱水力大于整粒种子的耐脱水力, 与龙眼 (Fu 等, 1990)、橡胶 (Normah 等, 1988) 和南洋杉 (Pritchard, 1986) 等种子相似。

2.1.2 经蔗糖、脯氨酸预处理后再脱水的效果 为了进行干燥胚轴的超低温保存,必须提高芒果离体胚轴的耐脱水力,尽量使其在较低含水量水平保持较高的生活力。研究表明,蔗糖(Koster等,1988)和脯氨酸(Blum等,1976)与植物抗脱水的能力有关。将芒果离体胚轴先经5%,10%的蔗糖或5%,10%和15%的脯氨酸在15℃下处理24h后,再采用硅胶分别脱水6,7和8h,然后接种至培养基上测定发芽率和根、芽的长度(表2,3)。结果表明,经5%和10%蔗糖预处理后再脱水6h的离体胚轴,与对照相比,发芽率从80%分别提高至100%和90%,根长从0.8cm分别提高至1.0cm和0.9cm,而芽长未变化。而经蔗糖预处理后再脱水7h和8h的胚轴,与对照相比,发芽率及根、芽的长度皆未变化。经5%和10%脯氨酸预处理再脱水6h和7h的离体胚轴,与对照相比,发芽率有所提高,而根、芽的长度未变化。经15%的脯氨酸预处理后再脱水的离体胚轴与对照相比,发芽率皆降低,可能是浓度太高的缘故。本研究结果表明,虽然蔗糖和脯氨酸预处理能在一定程度上提高离体胚轴的耐脱水力,但效果不显著。

表2 芒果离体胚轴经蔗糖预处理,再经硅胶脱水后,接种至培养基上培养20天的情况 cm

蔗糖浓度 /%	脱水6h			脱水7h			脱水8h		
	发芽率 /%	根长	芽长	发芽率 /%	根长	芽长	发芽率 /%	根长	芽长
0(对照)	80	0.8	0.3	80	0.3	0.2	70	0.3	0.2
5	100	1.0	0.3	80	0.4	0.2	70	0.3	0.2
10	90	0.9	0.3	80	0.3	0.2	70	0.2	0.2

表3 芒果离体胚轴经脯氨酸预处理,再经硅胶脱水后,接种至培养基上培养20天的情况 cm

脯氨酸 浓度/%	脱水6h			脱水7h			脱水8h		
	发芽率/%	根长	芽长	发芽率/%	根长	芽长	发芽率/%	根长	芽长
0(对照)	80	0.8	0.3	80	0.3	0.2	70	0.3	0.2
5	100	0.8	0.3	80	0.3	0.2	80	0.4	0.2
10	90	0.9	0.3	90	0.3	0.2	70	0.3	0.2
15	40	0.6	0.3	30	0.2	0.2	30	0.3	0.2

2.2 干燥芒果离体胚轴的贮藏

2.2.1 常温及常规低温贮藏 将含水量分别为26.0%,12.0%和10.6%的干燥离体胚轴密封于无菌小瓶中,分别在25~28℃,15℃,5℃和-20℃中贮藏0,10,30和60天,结果所有干燥离体胚轴在各温度下贮藏10天,生活力皆完全丧失,说明常温及常规低温不适于芒果干燥离体胚轴的保存。至于干燥离体胚轴在常温及常规低温下快速(10天以内)丧失生活力的原因,有待进一步研究。

2.2.2 超低温贮藏 将含水量分别为38.6%,30.4%,25.7%,20.4%,18.6%,16.4%,13.2%,10.8%及8.7%的干燥离体胚轴经或不经防冻剂(10%二甲基亚砷+10%甘露醇,或者10%二甲基亚砷+10%脯氨酸)预处理后,密封于无菌锡箔袋中,然后分两种方式放入LN₂中:(1)直接投入LN₂;(2)先分步冷冻(15℃中15min,5℃中30min及-20℃中2h),然后再投入LN₂中。在LN₂中贮藏24h后取出,分别采用3种方式解冻:(1)室温自来水解冻;(2)0℃水浴解冻及(3)40℃热水解冻。解冻后的离体胚轴接种至培养基上测发芽率或用TTC染色法测生活力(表4)。结果表明,所试不同含水量的干燥离体胚轴在放入LN₂前皆具有不

同程度的发芽率(47% ~ 100%), 但放入 LN₂ 中贮藏 24 h, 再解冻培养 10 天后, 皆不能萌发, 且解冻后的离体胚轴立即用 TTC 染色皆呈负反应, 表明离体胚轴在解冻后生活力已完全丧失, 可能是冰冻或解冻速度不适宜而造成的。

表 4 不同含水量的芒果干燥离体胚轴经不同方式液氮保存 24 h 后, 接种至培养基上培养 10 天的结果⁽¹⁾

含水量 /%	未经 LN ₂ 贮藏		不加防冻剂 LN ₂ 贮藏				加防冻剂 LN ₂ 贮藏			
	GP	TTC	直接放入 LN ₂		分步冷冻		直接放入 LN ₂		分步冷冻	
			GP	TTC	GP	TTC	GP	TTC	GP	TTC
38.6	100	+	0	-	0	-	0	-	0	-
30.4	100	+	0	-	0	-	0	-	0	-
25.7	100	+	0	-	0	-	0	-	0	-
20.4	100	+	0	-	0	-	0	-	0	-
18.6	100	+	0	-	0	-	0	-	0	-
16.4	100	+	0	-	0	-	0	-	0	-
13.2	96	+	0	-	0	-	0	-	0	-
10.8	84	+	0	-	0	-	0	-	0	-
8.7	47	+	0	-	0	-	0	-	0	-

(1)GP = 发芽率(%); TTC 为 TTC 染色结果。

3 小结

本文结果表明:

- 3.1 芒果离体胚轴的耐脱水力大于其整粒种子的耐脱水力, 可干燥至 11% 的含水量水平而仍保持 70% 的生活力。
- 3.2 蔗糖、脯氨酸预处理对提高芒果离体胚轴耐脱水力的效果不大。
- 3.2 将适于 LN₂ 保存含水量水平的芒果干燥离体胚轴在 LN₂ 中贮藏后, 生活力丧失, 伤害可能发生在冰冻或解冻过程中。

参 考 文 献

- 王晓峰, 傅家瑞. 1991. 芒果种子的脱水与贮藏研究. 植物学报, 33(2): 118 ~ 123
- Blum A, Ebercon A. 1976. Genotypic Responses in Sorghum to Drought Stress III. Free Proline Accumulation and Drought Resistance. Crop Science, 16: 428 ~ 431
- Fu J R, Zhang B Z, Wang X F, et al. 1990. Physiological Studies on desiccation, wet storage and cryopreservation of recalcitrant seeds of three fruit species and their excised embryonic axes. Seed Science and Technology, 18: 743 ~ 754
- Koster K L, Leopold A C. 1988. Sugars and Desiccation Tolerance in Seeds. Plant Physiology, 88(3): 829 ~ 832
- Normah M N, Chin H F, Hor Y L. 1986. Desiccation and cryopreservation of embryonic axes of *Hevea brasiliensis*. Muell-Arg. Pertanika, 9: 229 ~ 303
- Pritchard H W, Prendergast P G. 1986. Effects of desiccation and cryopreservation on the

- In Vitro viability of the recalcitrant seed species *Araucaria hunsteinii* K. Schum. *Journal of Experimental Botany*, 37: 1388 ~ 1397
- Roberts E H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*, 1: 499 ~ 514
- Roberts E H, King M W. 1980. *Recalcitrant Crop Seeds*. Malaysia: Tropical Press SDN. BHD, 1~5

DESICCATION AND CRYOPRESERVATION OF EXCISED EMBRYONIC AXES OF MANGO SEEDS

Wang Xiaofeng¹ Fu Jiarui²

(1 Dept. of Biology, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642;

2 School of Life Science, Zhongshan Univ.)

Abstract

Excised embryonic axes of mango (*Mangifera indica*) seeds were more tolerant to desiccation than their whole seeds. After being desiccated to 11% moisture content, 70% of excised embryonic axes could germinate on culture medium. To some extent, pretreatment with 5% ~ 10% sucrose or proline could increase the tolerance of excised embryonic axes to desiccation, but the result was not obvious. Excised embryonic axes with different moisture content (from 8.7% to 38.6%) lost their viability entirely after storage in LN₂ for 24 hours.

Key words mango seeds; excised embryonic axes; desiccation; cryopreservation