

黄皮种子的保湿贮藏及胚轴的超低温保存^{*}

陆旺金¹ 金剑平² 向旭³ 傅家瑞³

(华南农业大学园艺系, 广州, 510642; 2 珠海市园艺研究所; 3 中山大学生物系)

摘要 以典型的顽拗性种子黄皮(*Clausena lansium*)为材料, 研究了其种子的保湿贮藏及胚轴的超低温保存. 结果表明: 部分脱水的生理成熟期种子, 每 100 g 种子混入 4~6 g 百菌清贮于 15℃, 800 多 d 后仍保持较高的发芽率及种子活力. 经梯度蔗糖、梯度蔗糖加脱落酸(Abscisic acid, ABA)及 110 g/L 蔗糖(Sucrose, Suc 蔗糖)+20 μmol/L ABA 预培养的生理成熟期胚轴, 脱水 8~10 h 后加入预冷的冰冻保护剂直接入液氮(Liquid Nitrogen, LN), 24 h 后取出, 37℃水浴解冻并转移至 30 g/L Suc 的木本植物培养基(Woody Plant Medium, WPM)中恢复生长, 两个月后再转移至含不同组合的萘乙酸(α-naphthaleneacetic acid, NAA)和 6- 基腺嘌呤(6- Benzyladenine, 6- BA)的 30 g/L Suc 的 WPM 培养基中生长两个月, 发现: 梯度蔗糖预培养的胚轴生根率为 50%, 而经梯度蔗糖加 ABA 及 110 g/L Suc+20 μmol/L ABA 预培养的胚轴则分别保持 30% 及 10% 的生根率, 并能诱导产生少量的愈伤组织; 用新鲜的胚轴及子叶为外植体, 能诱导产生愈伤组织并分化成苗.

关键词 黄皮种子; 保湿贮藏; 离体胚轴; 超低温保存

中图分类号 Q 945.66

顽拗性种子(Recalcitrant seeds)是一类对脱水及低温敏感的种子, 其种质保存相当困难. 目前, 人们通常采用保湿贮藏法延长其寿命(王晓峰等, 1991; 唐林凤等, 1993), 以达到短期(几个月到几年)贮藏的目的. 而超低温保存则被认为是保存顽拗性种质最有希望的途径(Stanwood, 1985), 但这方面的研究尚不多见(Fu et al, 1992; Normah et al, 1986; Pence, 1991; 1992), 国内则几乎是空白. 黄皮是典型的顽拗性种子, 本文报导黄皮种子的保湿贮藏及胚轴的超低温保存.

1 材料和方法

1.1 供试材料

供研究用的黄皮(*Clausena lansium*)于 1994 年和 1995 年采自广州市郊岭南园艺厂, 品种为“鸡心”.

1.2 种子的保湿贮藏

采用新鲜的生理成熟期种子(74 DAA, DAA 为花后天数), 用自来水反复冲洗, 自然干燥 1~2 d 后, 每 100 g 种子混入 4~6 g 百菌清, 充分混匀后装入塑料袋, 密封贮于 15℃培养箱中, 定期检验种子活力.

1.3 胚轴的预培养

用未成熟及成熟种子的胚轴经体积分数为 70%乙醇消毒 5~10 s, 1 g/L HgCl₂ 再消毒

1997-01-13 收稿 陆旺金, 男, 30 岁, 助理研究员, 博士

* 中山大学国家自然科学基金及广东省自然科学基金资助课题

5 min, 无菌水洗净后作以下几种预培养

1.3.1 梯度蔗糖预培养 将消毒洗净的胚轴接种于 30 g/L 蔗糖(Sucrose, Suc)的木本植物培养基(Woody Plant Medium, WPM)琼脂培养基(pH 5.8)中, 每 2 d 依次转移至含 110、190、270 和 350 g/L Suc 的 WPM 培养基中培养 2 d.

1.3.2 梯度蔗糖加脱落酸(Absciscic acid, ABA)预培养 方法同 1.3.1, 只是在各培养基中加入 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA.

1.3.3 高添加 ABA 预培养 110 g/L Suc 的 WPM 琼脂培养基中加入 20 $\mu\text{mol/L}$ ABA 培养 9 d.

1.4 胚轴的超低温保存

所有经预培养的胚轴置于超净工作台上吹风脱水 8~10 h, 同时测出胚轴的含水量, 将胚轴置于冻存管中, 冰浴 30 min 后, 加入预冷的冰冻保护剂: 100 g/L Suc+体积分数 7.5%二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)或 100 g/L Suc+5 mol/L 丙二醇, 30 min 后入液氮(Liquid Nitrogen LN), 24 h 后取出, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴化冻(2~3 min).

1.5 活力鉴定

超低温保存后的胚轴采用恢复生长法鉴定其活力. 将胚轴接种于 3 g/L Suc 的 WPM 琼脂培养基中, 并于恢复生长两个月后转移至含不同组合的萘乙酸(α -naphthaleneacetic acid, NAA)及 6-基腺嘌呤(6-Benzyladenine, 6-BA)的 WPM 琼脂培养基中. 保湿贮藏的种子活力采用玻板直立发芽法(温度, 25 $^{\circ}\text{C}$), 10 d 后统计其简易活力指数.

1.6 愈伤组织、胚状体及成苗的研究

分别用新鲜种子的胚轴、胚轴萌发后的初生根及子叶为外植体, 采用 MT 培养基添加不同的生长调节剂组合(见 2.2)以诱导愈伤组织, 再使其分化或经胚状体途径分化成苗.

2 结果和讨论

2.1 黄皮种子的保湿贮藏

采用了不同含量的百菌清(每 100 g 种子混入 2~6 g 百菌清)及不同温度(10、15、20 $^{\circ}\text{C}$)研究黄皮种子的保湿贮藏, 发现部分脱水的 100 g 黄皮种子混入 4~6 g 百菌清贮于 15 $^{\circ}\text{C}$ 效果最好. 因此, 本研究采用这一处理. 74 DAA 的种子保湿贮藏 480 d 后, 发芽率为 100%, 600 d 后发芽率开始下降, 但直至 840 d 发芽率仍保持 70%. 保湿贮藏过程中, 虽然活力指数不断下降, 但仍保持一定水平(表 1), 如萌发时间延长, 15 $^{\circ}\text{C}$ 保湿贮藏 840 d 的种子基本上都能发芽, 活力亦保持一定的水平(数字未列出). 黄皮种子保湿贮藏过程中, 虽然含水量不断下降, 但速度非常缓慢, 840 d 后含水量下降幅度不到 5%, 自然干燥的黄皮种子含水量下降至 45.6%时, 发芽率仍为 100%, 活力指数为 30(Fu et al, 1994), 而保湿贮藏的种子含水量为 45.4%时, 发芽率及种子活力仅分别为 80%及 15.0(表 1). 因此保湿贮藏过程中种子活力的降低与绝对含水量无关. 快速脱水的种子较慢速脱水的种子致死含水量低(Berjak et al, 1993), 而保湿贮藏的过程就是一个缓慢脱水的过程(表 1), 顽拗性种子保湿贮藏过程中与萌发有关的代谢作用并未停止(Farrant et al, 1989), 并且, 随着贮存时间的延长, 临界含水量提高(Farrant et al, 1986). 因此, 作者认为: 保湿贮藏过程中种子活力的降低与贮存过程中种子的缓慢脱水有关.

表 1 部分脱水的黄皮种子 15℃ 贮存的效果

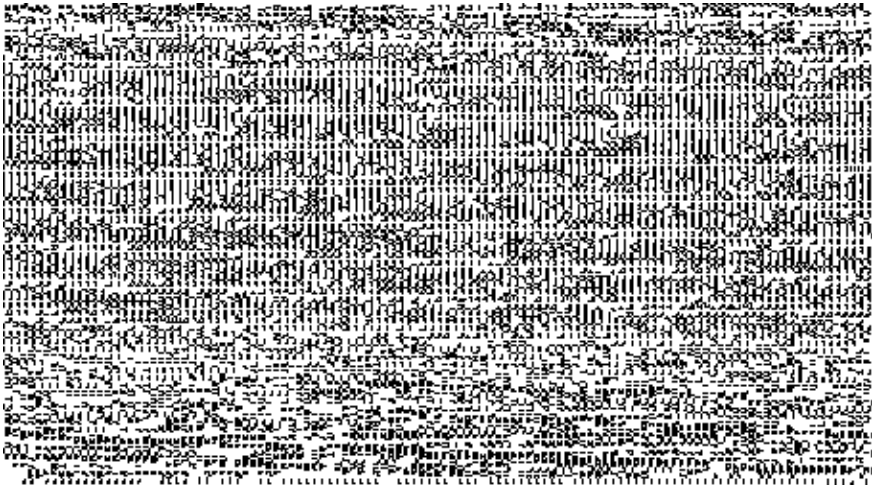
| 项目 | $t_{\text{湿存}}/\text{d}$ | | | | | | | |
|---------|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 120 | 240 | 360 | 480 | 600 | 720 | 840 |
| 发芽率(%) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 90 | 80 | 70 |
| 活力指数 | 42.3 | 46.0 | 38.5 | 31.9 | 25.4 | 19.0 | 15.0 | 11.2 |
| 鲜含水量(%) | 49.4 | 48.8 | 48.1 | 47.5 | 46.6 | 45.8 | 45.4 | 44.6 |

另外, 作者还研究了不同发育时期的每 100 g 种子混入 4~6 g 百菌清, 15℃ 保湿贮藏的效果. 未成熟的种子保湿贮藏 1 个月后, 种子表面已开始皱缩, 虽然此时发芽率无变化, 但活力指数已大大降低, 4 个月后, 种皮严重内陷, 53 DAA 种子甚至表皮开始变褐, 发芽率及活力指数均大大下降. 生理成熟期稍过(如 88 DAA)的种子贮存效果亦较好. 因此, 作者认为: 黄皮种子的保湿贮藏应选用生理成熟期的种子, 同时每 100 g 种子混入 4~6 g 百菌清贮于 15℃.

2.2 黄皮胚轴的超低温保存

由于顽拗性种子含水量高, 又忌脱水和低温 (Roberts, 1973), 因此超低温保存必须先解决耐脱水问题. 不经预培养直接脱水的胚轴, 无论采用直接降温还是程序降温都不耐 LN 贮藏, 经 30 g/L Suc+10 $\mu\text{mol/L}$ ABA 及 110 g/L Suc+10 $\mu\text{mol/L}$ ABA 预培养的黄皮胚轴, 快速降温加冰冻保护剂超低温保存后, 均未显示生长迹象.

经梯度蔗糖及梯度蔗糖加 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA 预培养的黄皮胚轴, 超低温保存后均显示较高的生活力, 而 110 g/L Suc+20 $\mu\text{mol/L}$ ABA 预培养的胚轴, 超低温保存后成活率则较低(表 2). 将超低温保存后并恢复生长两个月的胚轴, 转移至含不同组合的 NAA (0.0.5、2.0 mg/L) 及 6-BA (0.0.5、2.0 mg/L) 的 WPM 琼脂培养基中, 结果均只能诱导产生少量的愈伤组织(图 1 中胚轴两端膨大的部分), 而未见有芽的生长. 不同的顽拗性种子根、茎对脱水及低温的敏感性有别 (Pence, 1992), 但就黄皮而言, 作者认为: 与根原基端相比, 芽原基端对低温更敏感.



从左至右预培养方法依次为: 110 g/L Suc+20 $\mu\text{mol/L}$ ABA; 梯度蔗糖及梯度蔗糖加 ABA

图 1 黄皮胚轴超低温保存效果(恢复生长 4 个月)

由于超低温保存后的胚轴只保持生根及产生愈伤组织的能力,因此,研究了新鲜的胚轴、胚轴的初生根及子叶为外植体诱导产生愈伤组织及成苗的方法,以期为超低温保存后的胚轴成苗提供理论依据.研就表明:以胚轴及子叶为外植体均能诱导产生愈伤组织(培养基配方为:MT基本培养基添加0.5 g/L 麦芽粉,2 mg/L 2,4-D,0.2 mg/L 6-BA,50 g/L Suc,pH 5.8,诱导一个月,中间继代一次),然后,再促使该愈伤组织分化成苗(分化培养基配方为:1.0 mg/L 6-BA,0.5 mg/L NAA,30 g/L Suc,pH 5.8的MT培养基).

表2 黄皮胚轴超低温保存效果

| 预培养方法 | 含水量(%) | 冰冻保护剂 | 生根率(%) | |
|-------------------|--------|-------------------------------------|--------|-----|
| | | | -LN | +LN |
| 梯度蔗糖 | 21.3 | 100 g/L Suc+7.5% ¹⁾ DMSO | 87.5 | 50 |
| 梯度蔗糖加 ABA | 20.3 | 100 g/L Suc+7.5% ¹⁾ DMSO | 75.0 | 30 |
| 110 g/L Suc 加 ABA | 24.4 | 100 g/L Suc+5 mol/L 丙二醇 | 57.0 | 10 |

1) 体积分数

本研究结果为保存黄皮种质提供了切实可行的方法.采用保湿贮藏,同时每100 g种子添加4~6 g 百菌清贮于15℃,840 d后种子仍保持较高的发芽率及活力指数.就已研究的顽拗性种子的超低温保存看,只有可可(Pence,1991)等少数几种顽拗性种子的胚轴在超低温保存后产生了幼苗,其余的如龙眼(Fu et al,1994)及栎、栗(Pence,1992)等的胚轴超低温保存后均只能产生愈伤组织、生根或茎的能力.本研究也只能使超低温保存后的胚轴产生愈伤组织及生根的能力.因此,研究方法仍需进一步改进,如:是否可以通过改进预培养的方法、采取程序降温、增加冰冻保护剂的种类及调节恢复生长培养基的配方等;另外,该研究还以新鲜的子叶及胚轴为外植体,诱导产生了愈伤组织并能分化成苗,为长期保存种质提供了理论基础.

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
- 唐林风,傅家瑞.1993.木菠萝 *Artocarpus heterophyllus* 种子湿藏的研究.中山大学学报(自然科学版),33(2):111~115
- Berjak P, Vertucci C W, Pammenter N W. 1993. Effect of development status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation - sensitivity in recalcitrant seeds of *Camellia sinensis*. *Seed Sci Res*, 186: 249~261
- Farrant J M, Pammenter N W, Berjak P. 1986. The increasing desiccation - sensitivity of recalcitrant *Avicennia marina* with storage time. *Physiol Plant*, 67: 291~298
- Farrant J M, Pammenter N W, Berjak P. 1989. Germination - associated events and desiccation - sensitivity of recalcitrant seeds: a study on three unrelated species. *Planta*, 178: 189~198
- Fu J R, Xia Q H, Tang L F. 1992. Effects of desiccation on excised embryonic axes of three recalcitrant seeds and studies on cryopreservation. *Seed Sci & Technol*, 21: 85~95
- Fu J R, Jin J P, Peng Y F, et al. 1994. Desiccation tolerance in two species with recalcitrant seeds: *Clasena lansium* (Lour) and *Litchi chinensis* (Sonn). *Seed Sci Res* 3: 275~281
- Norman M N, Chin H F, Hor Y L. 1986. Desiccation and cryopreservation of embryonic axes of *Hevea*

brasilinesis Muel-Arg. *Pretanika* 9: 299 ~ 303

Pence V C. 1991. Cryopreservation of immature embryos of *Theobroma cacao*. *Plant Cell Rep*, 10: 144 ~ 147

Pence V C. 1992. Desiccation and survival of *Aesculus*, *Castanea*, and *Quercus* embryo axes through cryopreservation. *Cryobiol*, 29: 289 ~ 294

Roberts E H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci & Technol*, 1: 499 ~ 514

Stanwood P L. 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: Kartha, ed. *Cryopreservation of plant cells and organs*. Florida: CRC Press Inc Boca Raton, 199 ~ 276

WET-STORAGE OF *Clausena lansium* SEEDS AND CRYOPRESERVATION OF EMBRYONIC AXES

Lu Wangjin¹ Jin Jianpin² Xiang Xu³ Fu Jiarui³

(1 Dept. of Horti., South China Agric. Univ., Guangzhou, 510275.

2 Institute of Zhuhai Hort. Sci.; 3 Dept. of Biol., Zhongshan Univ.)

Abstract

Wet-storage of typical recalcitrant *Clausena lansium* seeds and cryopreservation of their excised embryonic axes were studied. The results showed: mixed with 4 ~ 6 g chlorthalonil per 100 g seeds and stored in polyethylene bags for more than 800 d, the germination percentage and vigor-index of partially-desiccated physiologically matured seeds remained relatively high levels. The physiologically matured axes precultured with gradient-sucrose, gradient-sucrose plus 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA and 110 g/L Suc plus 20 $\mu\text{mol/L}$ ABA were desiccated 8 ~ 10 h, and plunged into liquid nitrogen (LN) directly for 24 h, transferred to 30 g/L Suc WPM-agar medium (pH 5.8) for 2 months after rapid thawing (37 $^{\circ}\text{C}$, water bath), then transferred to 30 g/L Suc WPM-agar with different combination of NAA and 6-BA for another 2 months for the survival of cryopreserved axes, the root-initiation percentage precultured in gradient-sucrose was 50%, and precultured in gradient-sucrose plus 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA, 11% Suc + 20 $\mu\text{mol/L}$ ABA were 30%, 10% respectively; Using fresh embryonic axes and the fresh cotyledons as explants, seedling could be developed from callus.

Key words *Clausena lansium* seeds; wet-storage; excised axes; cryopreservation