

液氮保存对南瓜种子生理生化特性的影响

蒋 燕¹, 郝文利², 田 野¹

(1. 河南科技大学 河南 洛阳 471003; 2. 河南省浚县农场, 河南 鹤壁 458030)

摘 要:以南瓜种子 Pu5004 为试材, 将含水量从 10.39% 分别降至 9.16%、6.75% 和 3.24%, 液氮(LN₂)保存 24 h 后, 运用快速和常温 2 种方法解冻, 测定种子发芽率、活力指数、发芽指数及电导率、过氧化物酶含量等活力指标, 探讨液氮保存对南瓜种子活力及生理生化特性的影响。结果表明: 影响南瓜种子液氮保存的主要因素是种子含水量; 随含水量降低, 发芽率、发芽指数、活力指数降低; 种子选择透性受到影响, 细胞膜修复能力减弱, 酶活性降低; 解冻方式也是影响液氮保存的一个因素, 快速解冻种子活力高。

关键词: 南瓜种子; 液氮; 含水量; 快速解冻; 超低温贮藏

中图分类号: S 642.104⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)02-0077-03

南瓜(*Cucurbita moschata* Duch.) 属葫芦科南瓜属 1a 生蔓性草本植物^[1,2]。种子含南瓜籽氨酸、脂肪油、维生素 K 等物质^[3,5]。随着南瓜用途的广泛开发, 南瓜已成为我国市场周年供应的主要种类之一。通过对种子保存研究, 对其种质保存、利用及研究有重要意义。

从 1973 年 Nag 等^[6]首次成功超低温保存了胡萝卜悬浮细胞以来, 国内外已对近 200 种植物材料进行了超低温保存。液氮(LN₂)保存又称超低温保存, 植物材料于超低温下(-196℃), 新陈代谢活动处于基本停止状态, 达到长期保存寿命的贮藏方法^[9]。保存中常用的有预冻法、两步法、玻璃化法^[7,8]和包埋脱水法^[10]。液氮保存使种质材料免受病、虫、毒的侵害, 保存后的再生植株, 有可能产生高抗寒性的新品种, 是省时、省工、省费用的低温保存新技术^[9]。

目前关于南瓜种子超低温保存的研究还较少, 试验以南瓜种子为材料, 采用不同的含水量水平, 运用不同的处理方式, 通过液氮保存, 探讨对南瓜种子活力及生理生化特性的影响, 以期为低温保存提供理论依据和参考。

1 材料与方 法

南瓜种子 Pu5004 由洛阳泰金园艺有限公司提供, 收获期 2004 年。采用硅胶法干燥种子^[12], 使种子含水量由初始值 10.39% 降至 9.16%、6.75%、3.24% 3 种水平。每含水量 4 个重复, 每重复 100 粒种子。根据《国际种子检验规程》^[11] 标准方法测定种子含水量。采用快速

冷冻方法, 直接投入液氮罐中贮藏。保存 24 h 后取出, 用快速和常温 2 种解冻方法。快速解冻将种子立即投到 40℃ 温水浴中, 放置 6~7 min; 常温解冻置于 (25±2)℃ 室温中, 自然冷却。

种子发芽试验参照《国际种子检验规程》^[11]。统计发芽率、发芽指数、活力指数等。种子浸出液电导率, 用宋松泉等^[2]种子生物学方法^[12]测定。过氧化物酶含量用郝再彬等^[14]植物生理实验方法测定。

2 结果与分析

2.1 种子含水量对超低温保存后种子发芽率的影响

超低温保存中, 材料的含水量是保存成败的关键因子^[15]。不同含水量种子进行干燥处理后, 超低温保存测定发芽率(见表 1)。由表 1 可见, 液氮保存后, 发芽率呈 2 种不同的变化趋势。含水量 9.16% 的南瓜种子发芽率提高, 含水量 6.75% 的南瓜种子发芽率降低。南瓜种子在从自然含水量向安全含水量干燥的过程中, 发芽率降低, 表明干燥过程对南瓜种子质量有一定不良影响; 而含水量 3.24% 的南瓜种子干燥到安全含水量(3.4%)以下, 发芽率低于对照, 表明过度干燥影响了种子质量, 降低发芽率。因此控制适宜的种子含水量, 是超低温保存成败的关键因素。含水量 9.16% 的南瓜种子发芽率提高, 其刺激作用的机理目前还不清楚。

表 1 不同含水量南瓜种子液氮保存后发芽率变化

种子含水量/%	发芽率	
	对照 %	液氮保存后/%
10.39	85	88
9.16	86	91
6.75	81	80
3.24	77	72

2.2 解冻方式对种子超低温保存的影响

超低温保存后, 采用快速和常温解冻 2 种解冻方法

第一作者简介: 蒋燕(1966), 女, 河南洛阳人, 硕士, 副教授, 现主要从事园艺专业教学及科研工作。E-mail: jyan@mail.houst.

edu.cn

收稿日期: 2008-08-24

(见表 2)。由表 2 可见,解冻方式对超低温保存后种子的发芽率有所影响。不同含水量种子,快速解冻后,其发芽率、发芽指数和活力指数均高于常温解冻。超低温保存中,冰冻伤害有时在冰冻过程中不发生,但在解冻过程中发生^[19]。缓慢解冻时,细胞内易发生剧烈再结晶,冰晶体增大,使细胞死亡;快速解冻能使其通过略低于冰融点的危险温度区而防止降温过程中所形成晶核生长对细胞损伤^[19]。

表 2 解冻方式对南瓜种子活力的影响

含水量/%	解冻方式	发芽率/%	发芽指数	活力指数
10.39	MT	88	24.950	45.254
	ST	83	23.732	41.401
9.16	MT	91	26.050	47.760
	ST	82	23.373	41.421
6.75	MT	80	21.092	40.002
	ST	75	21.079	36.829
3.24	MT	72	21.434	36.937
	ST	66	20.146	34.261

注 MT:快速解冻 ST:常温解冻。

2.3 细胞膜透性变化

种子浸出液电导率,表示种子活力高低。一般高活力种子能够快速的重建膜,且最大限度修复损伤。劣变种子由于细胞膜损伤和膜完整性的损失^[17],种子会向周围的溶液渗漏出较多的电解质。陈光仪等^[8]认为黄皮种子和木棉种子外渗液电导率变化和种子活力呈负相关,而荔枝种子无此相关性。南瓜种子液氮保存后,吸胀 4 h 后测定电导率(见表 3)。由表 3 可见,快速解冻种子浸出液电导率与对照无显著差异,说明快速解冻能使种子迅速通过危险温度区,对细胞膜的影响不大,种子仍有较高活力;通过常温解冻的种子与对照有显著差异,说明常温解冻,种子细胞膜受到了损伤,修复能力减弱,种子活力降低。含水量 9.16% 的种子与自然含水量电导率无显著差异,含水量 6.75% 的与自然含水量达显著差异,含水量 3.24% 的种子与自然含水量达极显著差异。表明随着种子含水量降低,电导率逐步增大,种子的选择性透性受到影响增大,种子活力下降。

表 3 不同含水量的南瓜种子液氮保存后的电导率

含水量/%	电导率 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$		
	对照	快速解冻	常温解冻
10.39	14.04	12.58	20.17 *
9.16	14.71	13.39	21.66 *
6.75	19.05 *	20.26	26.44 *
3.24	24.23 **	26.47	32.58 *

注 * 表示在 $\alpha=0.05$ 差异显著, ** 表示在 $\alpha=0.01$ 差异显著,下同。

2.4 酶活性变化

过氧化物酶是种子自身抵制活性氧,清除自由基有害物质的清除剂。种子过氧化物酶活性高,为萌发过程中清除细胞内脂质过氧化产生的毒害奠定有利基础。通过对南瓜种子过氧化物酶活性差异显著性分析可知

(表 4),含水量 9.16% 的与自然含水量的差异不显著;含水量 6.75% 的与自然含水量的差异显著;含水量 3.24% 的与自然含水量的差异极显著。即随种子含水量降低其过氧化物酶活性随之降低。

表 4 南瓜种子干燥处理后过氧化物酶活性变化

含水量/%	过氧化物酶/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
10.39	149.76
9.16	146.51
6.75	123.37 *
3.24	93.39 **

3 结论与讨论

3.1 南瓜种子超低温保存结果

超低温保存技术研究中,以材料放入液氮保存一定时间,取出后材料有一定的生活力来判断保存方法的成功与否^[20]。存入液氮的时间从 5 min 到几天甚至几年不等^[21]。试验将南瓜种子放至液氮罐中保存 24 h 后,种子具有活力,表明南瓜种子实现了超低温保存。

超低温保存研究中观察到,许多植物种子和花粉超低温保存后发芽率提高^[21-22]。试验也观察到液氮保存对南瓜种子发芽率有促进作用,这种刺激作用的机理目前还不清楚。

3.2 种子含水量对超低温保存的影响

种子超低温保存中,存在适宜含水量范围。对大多数种子而言,自然含水量一般都在液氮保存的安全含水量范围内,即液氮保存后种子有一定发芽率,这与石思信^[21]等对作物种子的超低温保存结果一致。从试验结果来看,南瓜种子超低温保存时没有必要进一步脱水干燥,这与低温种子保存不同,也显示了超低温保存种子的方便性,但是进一步干燥种子可以提高超低温保存后种子发芽率。因此,种子超低温保存中可依据种子的种类和工作目的而区别对待。对于迅速要求保存、量大的种子可以直接保存于液氮中;对种质保存质量要求高的种类,有条件时还应该研究超低温保存中可获最高种子发芽率的最佳种子含水量,并结合种子质量的其他指标,如活力、出苗率等,确定种子超低温保存的最适含水量。

3.3 解冻方式对南瓜种子超低温保存的影响

解冻方式对超低温保存后种子的种子活力有一定影响。快速解冻优于常温解冻。不同含水量种子,通过快速解冻后,种子迅速通过了危险温度区,种子的活力没有受到影响;其发芽率、发芽指数和活力指数要高于常温解冻。

3.4 液氮保存时间长短对存活率的影响及冻存后遗传稳定性

刘云国等^[23]研究表明,液氮保存不同时间对相对存活率基本没有影响,在 -196°C 情况下,生命活动基本停止。该试验南瓜种子液氮保存 1 d 后,存活率达 88%。

长期保存后的种子活力,有待进一步研究。

种质保存的目的是保存现有的种质性状,使之不流失。虽然超低温保存过程中发生基因变异的可能性微乎其微,比其他种质保存方法低的多,但保存后的材料发生变异的可能性仍然存在,南瓜种子保存后是否发生变异有待进一步研究。

参考文献

[1] 巩振辉. 茄子南瓜栽培新技术[M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2005: 99-100.
 [2] 刘保才. 蔬菜高产栽培技术大全[M]. 北京: 中国林业出版社, 1998: 49-50.
 [3] 山东农业大学. 蔬菜栽培各论[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 223-224.
 [4] 司亚平. 新特蔬菜种子选购与育苗技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 183-184.
 [5] 苏崇森. 现代实用蔬菜生产新技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
 [6] 陈勇. 胡萝卜悬浮培养细胞和原生质体的玻璃化法超低温保存[J]. 浙江大学学报(理学版), 2002, 29: 94.
 [7] 华泽钊. 低温生物医学技术[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 70.
 [8] 曹家树, 秦岭. 园艺植物种质资源学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 61-62.
 [9] 胡晋. 种子生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 322-323.
 [10] 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.

[11] 颜启传, 毕辛华. 译. 国际种子检验规程[M]. 北京: 中国农业出版社, 1985.
 [12] 宋松泉, 程红焱, 龙春林, 等. 种子生物学研究[M]. 北京: 科学出版社, 2005.
 [13] 胡晋. 种子贮藏加工[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001.
 [14] 郝再彬, 苍晶, 徐仲. 植物生理实验[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2004(11): 115-116.
 [15] 石思信. 超低温冷冻保存植物花粉和种子[M]// 马缘生主编. 作物种质资源保存技术. 北京: 学术书刊出版社, 1989: 119-143.
 [16] 徐刚标. 植物种质资源离体保存研究进展[J]. 中南林学院学报, 2002(12): 81-87.
 [17] 郭长根, 胡晋. 茶籽的超低温(-196℃)贮藏[J]. 浙江农业大学学报, 1991, 17(13): 243-249.
 [18] 陈光仪, 傅家瑞. 几种顽拗型种子的劣变. 植物生理通讯, 1989(3): 11-14.
 [19] 刘燕, 周慧. 园林花卉种子超低温保存研究[J]. 北京林业大学学报, 2001, 23(4): 39-44.
 [20] 张北壮, 傅家瑞, 徐是雄. 25种农作物及蔬菜种子的超低温贮存[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1990, 29(3): 115-121.
 [21] 石思信, 江朝余, 陶梅, 等. 利用液氮保存植物种子[C]// 马缘生主编. 作物种质资源保存研究论文集. 北京: 学术书刊出版社, 1989: 129-134.
 [22] 石思信, 田玥. 黑麦花粉长期冷冻保存试验初报[C]// 马缘生主编. 作物种质资源保存研究论文集. 北京: 学术书刊出版社, 1989: 92-95.
 [23] 刘云国, 王晓云. 苹果种质资源玻璃化法超低温保存技术[J]. 山东农业大学学报, 2002, 33(1): 32-36.

Influence on Physiological and Biochemical Characteristics of Pumpkin Seeds after Cryopreservation Abstract

JIANG Yan¹, HAO Wen-li², TIAN Ye¹

(1. Henan Science and Technology University, Luoyang Henan 471003, China; 2. Farm of Jun County, Hebi, Henan 458030, China)

Abstract: Used pumpkin seeds Pu5004 as materials, drying their water from 10.39% to 9.16%, 6.75% and 3.24% respectively at room temperature. Preserved 24 hours used liquid nitrogen(-196℃), used rapid thaw and thaw at room temperature of two methods. Measured the level of various indicators of the vitality of seeds: germination, vigor index, germination index and the conductivity peroxidase content to explore liquid nitrogen to pumpkin seeds physiological and biochemical characteristics. The results showed: moisture was an important factor affected pumpkin seeds in liquid nitrogen preservation. With the lower water content, Pumpkin seeds germination rate, germination index, vigor index also decreased. Seeds selectivity was also affected, membrane repair capacity was diminished, enzyme activity was decreased. In addition, the thawing method was also a factor in the preservation, seed vigor was high after rapid thaw.

Key words: Pumpkin seeds; Liquid nitrogen; Moisture content; Rapid thawing; Cryopreservation