

# 不同含水量对溪荪鸢尾种子保存效果的影响

许言<sup>1</sup>, 万宗喆<sup>1</sup>, 方佳楠<sup>1</sup>, 宝力格<sup>1</sup>, 萧萧<sup>1</sup>, 宋红<sup>1</sup>, 王玲<sup>1</sup>, 陈恒利<sup>2</sup>, 彭宏梅<sup>2</sup>, 范丽娟<sup>1\*</sup> (1. 东北林业  
大学园林学院, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 东北林业大学帽儿山实验林场, 黑龙江尚志 150611)

**摘要** [目的]研究不同含水量对溪荪鸢尾种子保存效果的影响。[方法]以寒地特色野生种溪荪鸢尾种子为材料,通过硅胶干燥法获得不同含水量的种子,在液氮中保存24 h后,采用水浴化冻、自来水水冲化冻和室温化冻3种化冻方式,检测不同条件下种子发芽率来检验保存效果。[结果]种子含水量为5.4%~7.2%时的干燥处理显著提高了种子发芽率,但含水量降到3.2%时会降低种子发芽率;种子含水量为7.2%时超低温保存后萌发率会显著提高,水浴化冻最适。[结论]最佳种子含水量为7.2%,保存后萌发率高达98.70%。

**关键词** 溪荪鸢尾;种子;超低温保存

**中图分类号** S722.1<sup>+</sup>7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)36-230-02

## Effects of Different Water Content on Preservation of *Iris sanguinea* Seed

XU Yan, WAN Zong-zhe, FANG Jia-nan, FAN Li-juan\* et al (The College of Landscape, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

**Abstract** [Objective] To study the effects of different water content on preservation of *Iris sanguinea* seed. [Method] There is no denying that liquid nitrogen cryopreservation is an ideal way to preserve germplasm for a long time. When using seeds as saving materials, the optimal moisture contents and thawed are very important to the effect of cryopreservation. This study uses the wild *Iris sanguinea* seeds for the experimental materials which are grow in cold places. We get the seeds of different water contents with the method of drying by silica gel, and then seeds were preserved in liquid nitrogen for 24 hours. Using three kinds of defrost modes to test the seed germination rate under different conditions to test effect. [Result] The results showed that seed moisture content was 5.4% - 7.2% of dry treatment had significant effect on seed germination rate, but will reduce the seed germination rate under 3.2% moisture content. Seed germination rate can significantly improve after cryopreservation when the moisture content was 7.2%. [Conclusion] The germination rate is as high as 98.70% when the optimum water content is 7.2%.

**Key words** *Iris sanguinea*; Seeds; Cryopreservation

超低温保存(cryopreservation)是将植物种质材料经过一定的技术手段处理后,放置到液氮(-196℃)中进行保存。在此温度下,植物材料的物质代谢和生命活动完全停止,并在需要时采用一定的技术方法使材料恢复活力<sup>[1-4]</sup>,该技术是目前将种质长期保存的有效的生物技术。超低温保存不受土地、人力等条件的限制,且取材方便、效率高,保证了种质的遗传稳定性,已被较多地应用于园林植物和农作物种质长期保存上<sup>[5]</sup>。至2010年,全球约740万份(含重复)植物资源采用超低温保存技术保存在国际、国家、地区或私人的基因库中<sup>[6]</sup>,其中美国、印度、日本等国建立的植物种质基因库库存数量逐年增多,规模日益增大。我国作为园林观赏植物种质资源大国,更应该加大对观赏植物种质资源的超低温保存技术研究与应用,尤其对还没得到充分开发和利用却在数量上不断减少或消失的种类,采取长期或永久性保存技术研究有着特殊意义。通常种子保存材料的含水量对保存成败有重要影响。一般认为材料含水量越少,受到的超低温冻害就越少,但不同种子保存材料都具有一个安全含水量范围,过度脱水也会对材料造成伤害。所以确定种子适宜的含水量对超低温保存效果至关重要。

溪荪鸢尾(*Iris sanguinea*)为鸢尾科鸢尾属多年生宿根花卉,在我国主要分布于东北地区,其耐水湿、耐寒,且花型奇特、花色艳丽、株型俊美,有很高的观赏和应用价值。溪荪鸢

尾是我国少有的耐寒、水陆两栖的夏季开花的蓝色花种类,也是难得的抗寒育种材料。近年来对鸢尾属溪荪的研究主要集中在种子生物学<sup>[7]</sup>、叶表微形态、叶和根的解剖学<sup>[8]</sup>、耐阴性<sup>[9]</sup>、抗旱性<sup>[10-11]</sup>、种间杂交亲和性<sup>[12]</sup>和生殖生物学方面<sup>[13]</sup>,而对于种质资源超低温保存的研究鲜有报道。目前由于生存环境破坏等原因导致野生溪荪鸢尾种质资源急剧下降,因此采取适当的保存措施进行资源保护是十分必要和迫切的。笔者选择溪荪鸢尾种子为试验材料,通过种子干燥法获得不同含水量的种子,研究不同含水量种子的超低温保存效果,进而获得溪荪鸢尾种子超低温保存适宜条件,并进行长期保存,以期为鸢尾属植物这类观赏价值较高的种质保存技术的进一步研究奠定基础。

## 1 材料及方法

**1.1 供试材料** 2013年秋季于东北林业大学实验基地采集溪荪鸢尾成熟种子,于室内自然阴干,并置于4℃冰箱内贮存备用。

## 1.2 研究方法

**1.2.1 溪荪鸢尾种子初始含水量测定** 种子含水量测定参照通用的《国际种子检验规程》<sup>[14]</sup>,采用烘干法对种子含水量进行测定。即将去杂种子放在电子天平上称量试样4.5~5.0g,3组重复,种子重量设为a。准备3个铝盒,放在烘箱内预先烘干直至恒重。将称好的溪荪鸢尾种子分别放在3个铝盒内,称取总重量b,然后放在(105±2)℃的烘箱内烘干(17±2)h后,称重设为c。种子含水量计算公式如下:

$$\text{种子含水量} = (b - c) / a \times 100\%$$

**1.2.2 溪荪鸢尾种子干燥处理** 采用硅胶干燥法进行干燥。在恒温25℃条件下,将种子用尼龙网袋包装后埋入干

**基金项目** 大学生国家级创新项目(201410225050);中央高校基本科研业务费专项(2572015BA07)。

**作者简介** 许言(1993-),男,黑龙江哈尔滨人,本科生,专业:园林。  
\*通讯作者,讲师,硕士,从事园林植物种质资源研究。

**收稿日期** 2015-11-30

干燥器的硅胶中进行干燥,种子与硅胶重量比为 1:10,干燥器中的硅胶每天需要用经 105 ℃ 充分干燥冷却后的硅胶进行更换。根据种子的含水量和脱水速度,每隔一段时间对干燥过程中的种子进行取样称重,在达到要求的含水量范围时取出。干燥后的种子用铝箔袋密封包装备用。成熟种子室内自然干燥后的含水量是 9.5% (作为对照),根据含水量梯度设计需要,取不同含水量的种子作为超低温保存试验材料,含水量分别是 7.2%、5.4% 和 3.2%。

**1.2.3 种子超低温保存及解冻。**将经过适度干燥的溪荪鸢尾种子装入 1.8 ml 的冻存管中,每个冻存管中装入的种子量以不超过冻存管容积的 2/3 为宜,将瓶盖拧紧,再将装有种子的冻存管放在冻存管架上分别标记好后投入液氮(-196 ℃)冻存。冻存一段时间后(视具体需要而定,该试验采用冻存 24 h),将冻存管从液氮中取出,用不同的化冻方法:水浴化冻、自来水水冲化冻和室温化冻方法解冻,分别是 40 ℃ 水浴 5~6 min 化冻;18 ℃ 左右自来水冲洗 6~7 min 化冻;室温(25±2)℃ 中静置约 30 min 化冻。不同含水量种子液氮保存后经 3 种解冻方式处理,其中水浴化冻的解冻速度最快,属于快速化冻;室温化冻的速度最慢,属于慢速化冻;自来水冲洗化冻的速度介于两者之间。化冻后将种子从冻存管中取出,进行发芽率检测。

**1.2.4 溪荪鸢尾种子发芽率测定。**将保存前的种子(其中经过干燥处理而未经液氮保存的种子在浸种前需要放在室内条件下回湿 24 h)和经液氮保存化冻后的种子采用 100 μg/g 6-BA 浸种 24 h,之后用清水冲洗 3 遍,放入培养皿在光照培养箱中进行萌发。培养皿内要垫上厚度均匀的脱脂棉,其上再垫一层滤纸并用蒸馏水浸透脱脂棉和滤纸,以滤纸表面湿润而无积水为宜。每个培养皿均匀放置种子 50 粒,重复 3 次。光照培养箱中发芽条件为:昼夜变温处理,即 30 ℃ (8 h)/20 ℃ (16 h),保持培养皿内滤纸的湿润。以后每天查看种子发芽情况,从有种子萌芽开始,记录种子每天的发芽个数,直至连续几天内无再发芽种子。发芽率计算公式如下:

$$\text{发芽率} = (\text{发芽的种子数} / \text{供监测的种子数}) \times 100\%$$

## 2 结果与分析

**2.1 不同含水量种子发芽率的比较** 以自然干燥的种子为对照,超低温保存前不同含水量种子的萌发率有所不同。由表 1 可知,自然干燥的种子发芽率是 94.70%,含水量为 7.2% 时的种子发芽率最高,达到 97.40%,与对照差异显著,与含水量 5.4% 时的种子发芽率(96.70%)接近;含水量为 3.2% 时种子发芽率最低,为 88.70%,与对照差异显著。由此可见,溪荪鸢尾种子经由适当的脱水有利于提高发芽率,然而过度脱水会导致种子发芽率降低。

**2.2 不同解冻方式对不同含水量种子保存后发芽率的影响** 由表 2 可知,不同含水量种子处理后仍能保持 88.70% 以上的发芽率,可见溪荪鸢尾种子具有较高活力和较强的生命力,种子品质比较好。3 种解冻方式中水浴化冻对含水量 9.5%、7.2%、5.4% 的种子化冻效果较好,相对室温化冻、自来水水冲化冻方式具有较高的发芽率,说明溪荪鸢尾种子超

低温储藏后更适合水浴化冻方法解冻。其中,含水量为 7.2% 的种子经水浴化冻后的发芽率高达 98.70%,与含水量 9.5% 种子的发芽率差异不显著,与含水量 5.4%、3.2% 种子的发芽率差异显著;含水量为 9.5%、7.2% 时的种子保存后发芽率还有所提高;而对于含水量 3.2% 的种子来说,保存前后发芽率没有明显变化,但较其他含水量种子发芽率较低,并且差异显著。可见溪荪鸢尾种子超低温保存含水量不是越低越好;水浴化冻更适合冻存后种子活力恢复。

表 1 不同含水量对溪荪种子发芽率的影响

含水量/%	种子数/颗	种子发芽率/%
9.5	50	94.70±0.40b
7.2	50	97.40±0.63a
5.4	50	96.70±0.67a
3.2	50	88.70±0.67c

注:同列数据后小写字母不同表示差异达显著水平( $P < 0.05$ )。下同。

表 2 超低温保存后不同化冻方式对溪荪种子发芽率的影响

含水量/%	种子数/颗	化冻方式		
		水浴化冻种子发芽率/%	自来水水冲化冻种子发芽率/%	室温化冻种子发芽率/%
9.5	50	96.60±0.68a	92.70±1.76a	92.70±1.80a
7.2	50	98.70±1.33a	92.70±3.67a	95.40±2.33b
5.4	50	94.00±3.46b	90.70±3.71a	93.50±2.41a
3.2	50	90.00±2.89c	88.70±1.76b	90.80±2.43a

## 3 结论与讨论

(1)通常保存材料的含水量被认为对保存成败有重要影响,一般认为材料含水量越少,受到的超低温冻害就越少,但不同保存材料都具有一个安全含水量范围,过度脱水也会对材料造成伤害。河英虎<sup>[15]</sup>研究认为合欢种子在 10% 的自然含水量下保存于液氮中发芽率、发芽势和发芽指数最高,而青杆种子需经过干燥脱水至含水量为 4% 时超低温保存种子萌发力较好。卢玲<sup>[16]</sup>研究得出高山栲种子脱水至含水量为 20.36% 是比较好的超低温保存含水量条件。该研究中干燥处理在超低温保存前后对种子的影响不同,含水量在 7.2%~9.5% 内对种子活力影响不显著,超低温保存后活力还会提升,最佳条件是含水量为 7.2%,保存后的发芽率高达 98.70%。

(2)理论上认为,超低温保存后的化冻过程中细胞内的次生结冰会对细胞产生机械损伤,从而降低超低温保存的成功率<sup>[17]</sup>。但该研究发现溪荪鸢尾种子在含水量为 9.5%、7.2% 时,超低温保存后发芽率有所升高,尤其含水量在 7.2% 时,发芽率高达 98.70%,这一结果可能与溪荪鸢尾种子自身的结构特点有关。溪荪鸢尾主要分布在东亚的北温带乃至寒带,所处地区冬季极其严寒,温度可达 -40 ℃ 左右,而 -30~-50 ℃ 被认为是冰晶生长和形成的“危险温度区”。一般温度达到 -30℃ 附近时,细胞内水分发生“同核结冰”,即水分子以自身为结晶核形成冰晶,使细胞中水分进入过冷却状态,细胞质浓度越高,过冷却点越低,而溪荪鸢尾成熟种子自然含水量就较低,细胞质浓度相对很高,所以对溪荪鸢尾种子来说,含水量为 9.5%、7.2% 直接进行超低温保存效果较好。

均呈上升趋势。与 2010 年试验样地平均单株材积相比, 2014 年试验样地的平均单株材积提高了 41.04%, 而对照样地仅提高 32.30%。对试验样地和对照样地平均单株材积的统计数据进行  $t$  检验表明, 2010 年的数据无显著性差异, 而 2014 年试验样地的平均单株材积 ( $0.0653 \text{ m}^3$ ) 显著高于对照样地 ( $0.0553 \text{ m}^3$ ) ( $P < 0.05$ )。由此可见, 通过对麻栎林进行定向培育, 可明显促进其单株材积的增长。

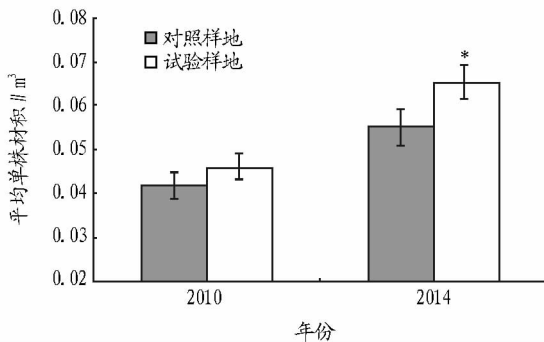


图 2 麻栎试验样地与对照样地平均单株材积

### 3 结论与讨论

对岱岗林场珍贵树种麻栎林定向培育后的林分生长情况进行了初步研究, 结果表明定向培育可明显促进麻栎胸径和材积的生长。分析原因, 一方面麻栎是喜光树种, 通过定向培育增强了麻栎林的透光性, 促进了其生长发育, 促进了麻栎根系吸收更多的养分和水分供给林木; 另一方面通过定向培育可增加林地枯落物, 提高林地枯落物和土壤的含水量和养分含量, 进而减少林地植被与麻栎林对养分和水分的竞争, 提高林分质量, 加速林木生长。

通过对麻栎林进行定向培育, 可明显促进其胸径增长, 相应促进其单株材积的增长, 该研究具有较好的示范和带动作用。

#### 参考文献

- [1] 曹一达. 麻栎能源林定向培育关键技术研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2009.
- [2] 于成琦, 刘辉, 霍玉华, 等. 麻栎菌材林定向培育技术初探[J]. 吉林林业科技, 2005, 34(5): 36-37.
- [3] 关玉秀. 测树学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1986: 72-77.

(上接第 231 页)

(3) 化冻方式是影响超低温保存的关键因素之一<sup>[18-19]</sup>。不同化冻方式处理, 在溪荪鸢尾种子超低温保存后对其发芽率有着显著影响。通过对不同化冻方式的比较分析可以知道, 种子的低温水浴化冻最佳, 室温化冻次之, 自来水水冲化冻最差。其中水浴化冻种子萌发率有所提高, 高达 98.70%。超低温保存后的化冻过程中细胞内的次生结冰对细胞会产生机械损伤, 从而降低超低温保存的成功率。一般认为快速化冻对种子发芽率的影响优于慢速化冻, 化冻速度由快到慢的化冻方法依次是水浴化冻、自来水水冲化冻、室温化冻。而溪荪鸢尾种子在最快化冻速度下(水浴化冻)和最慢化冻速度下(室温化冻)的发芽率均优于自来水水冲的发芽率, 其原因有待进一步验证分析。

(4) 对溪荪鸢尾不同含水量种子超低温保存后不同化冻方式的发芽率情况的分析可知, 溪荪鸢尾种子超低温保存条件为溪荪鸢尾种子在含水量为 7.2%~9.5% 可直接超低温保存, 保存后萌发率会有所提高; 低温水浴化冻最佳, 含水量为 9.5%、7.2% 时种子萌发率分别高达 96.60%、98.70%。超低温保存技术目前被认为是保存植物材料最有效最理想的方法, 在液氮的环境下, 植物材料所有的生命代谢活动几乎是停止的<sup>[20-21]</sup>, 可以实现永久保持组织培养植物形态发生的能力, 利于植物种质永续利用和便于不同地区间的种质交换。该研究确定了溪荪鸢尾种子液氮有效长期保存的条件, 也为鸢尾属植物其他种质保存提供了借鉴。

#### 参考文献

- [1] 程金水. 园林植物遗传育种学[M]. 北京: 中国林业出版社, 2000.
- [2] KARTHA K K, ENGELMANN F. Cryopreservation and germplasm storage [M]//VASIL I K, THORPE T A. Plant cell and tissue culture. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994: 195-230.

- [3] OZUDOGRU E A, PREVIATHI A, LAMBARDI M. In vitro conservation and cryopreservation of ornamental plants[M]//JAIN S M, OCHAR S J. Protocols for in vitro propagation of ornamental plants. UK: Humana Press, 2010: 303-324.
- [4] BANRABAS B, RAJKI E. Fertility of deep-frozen maize (*Zea mays* L.) pollen[J]. Annals of botany, 1981, 48: 861.
- [5] 刘燕, 周慧, 方标. 园林花卉种子超低温保存研究[J]. 北京林业大学学报, 2001(4): 39-44.
- [6] 王述民, 张宗文. 世界粮食和农业植物遗传资源保护与利用现状[J]. 植物遗传资源学报, 2011(3): 325-338.
- [7] 黄苏珍, 韩玉林, 谢明云, 等. 中国鸢尾属观赏植物资源的研究与利用[J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(1): 4-7.
- [8] 孙颖. 东北野生鸢尾属 6 种植物种子生物学及种苗发育过程的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2004.
- [9] 王玲, 仲铁, 卓丽环, 等. 鸢尾属部分种叶表微形态及其分类学意义[J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(6): 95-100.
- [10] 刘国华. 几种鸢尾属植物耐荫性的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2008.
- [11] 赵燕燕. 鸢尾属几种植物的抗旱性研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2007.
- [12] 王子风. 鸢尾属 6 种植物对干旱胁迫的响应[D]. 南京: 南京林业大学, 2009.
- [13] 毕晓颖, 姜琦, 郑洋. 马蔺与溪荪种间杂交亲和性研究[J]. 园艺学报, 2011, 38(5): 977-984.
- [14] 尚方剑, 王玲. 溪荪开花及传粉生物学特性[J]. 草业科学, 2014, 31(5): 892-897.
- [15] 河英虎, 傅伊倩, 刘燕. 合欢和青杆种子超低温保存研究[J]. 种子, 2013, 32(3): 33-35.
- [16] 卢玲, 王海英, 图雅, 等. 高山栲种子的超低温保存[J]. 东北林业大学学报, 2013(7): 6-8.
- [17] 颜启传, 毕辛华. 国际种子检验规程[M]. 北京: 农业出版社, 1985.
- [18] 王越, 刘燕. 观赏植物种质资源的超低温保存[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(3): 559-566.
- [19] 刘燕, 张亚利. 梅花花粉的超低温保存研究[J]. 北京林业大学学报, 2004, 26(S1): 22-25.
- [20] NIINO T, TANAKA D, TANTELY R R, et al. Cryopreservation of basal stem buds of in vitro-grown mat rush (*Juncus* spp.) by vitrification[J]. Cryo letters, 2007, 28(3): 197-206.
- [21] TOWILL L E, WATERS C. Cryopreservation of pollen [C]//ENGELMANN F, TAKAGI H. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000: 115-120.