

顽拗性竹柏种子的贮藏特性\*

计明月<sup>1 2</sup>, 张楠<sup>1 2</sup>, 闫启<sup>1 2</sup>, 文彬<sup>1\*\*</sup>

(1 中国科学院西双版纳热带植物园热带森林生态重点实验室, 云南 勐腊 666303;  
2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 文章对竹柏 (*Podocarpus nagi*) 种子的脱水耐性和贮藏特性进行了研究, 结果表明: 竹柏种子成熟时初始含水量约为 (35 ± 0.7) %, 种子对脱水敏感, 其最低安全含水量约为 (16.86 ± 0.73) %, 具有顽拗性种子的典型特征; 湿藏和半干藏都可以作为短期保存竹柏种子的方法, 且以 4 °C 保存优于 15 °C 保存, 但不管种子含水量如何, 零下低温保存对竹柏种子都是致命的; 半干藏法保存实验中, 未进行脱水处理的种子 (对照) 在 4 °C 贮藏 6 个月, 种子萌发率没有发生明显下降, 但贮藏期延长到 9 个月时, 临界含水量的种子萌发力保存最高; 不管贮藏介质的含水量高低, 也无论贮藏在 4 °C 还是 15 °C, 湿藏种子在 9 个月的贮藏期内萌发率均没有明显的降低, 但当贮藏到 12 个月时, 15 °C 湿藏种子的萌发率显著高于 4 °C 贮藏的种子, 但 15 °C 湿藏的种子在贮藏到 3 个月时即发现种子在贮藏期间萌发, 且随着贮藏介质含水量的升高和贮藏期的延长, 萌发的种子增多; 竹柏的离体胚经过 2 h 硅胶快速脱水至含水量 7% 后再冷冻即可获得 90% 以上的融后存活率, 且超低温保存 1 年的离体胚解冻后, 与只保存 1 周的存活率没有明显差异, 表明超低温长期保存竹柏种子是可行的。本研究可以为进一步探究顽拗性种子的短期贮藏和长期保存提供理论基础和基础资料。

关键词: 顽拗性种子; 竹柏; 脱水耐性; 湿藏; 半干藏; 超低温保存

中图分类号: Q 945

文献标志码: A

文章编号: 2095-0845(2015) 01-063-08

Storage Behavior Characteristics of Recalcitrant  
*Podocarpus nagi* Seeds\*

Ji Ming-yue<sup>1 2</sup>, ZHANG Nan<sup>1 2</sup>, YAN Qi<sup>1 2</sup>, WEN Bin<sup>1\*\*</sup>

(1 Key Laboratory of Tropical Forest Ecology, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla, Yunnan 666303, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** This paper studied desiccation tolerance and optimal storage methods of *Podocarpus nagi* seeds and achieved the following results: *Podocarpus nagi* seeds were desiccation sensitive and recalcitrant, with an initial moisture content of (35 ± 0.7) % and a critical moisture content of (16.86 ± 0.73) %; both moist storage and partially-dried storage can be applied to short-term conservation of *Podocarpus nagi* seeds in practice, and storage at 4 °C produced better results than that at 15 °C, but storage at sub-zero temperature was lethal no matter what seed moisture content was; In the partially-dried seed storage experiment, the un-dried seeds (the control) had no obvious viability decrease during 6-months' storage duration at 4 °C but seeds at critical moisture content had higher viability than those at other moisture contents after 9-months storage; no matter what media moisture content was used, and whether stored at 4 °C or 15 °C, 9-months' moist storage did not reduce *Podocarpus nagi* seed viability while seeds stored at 15 °C had significantly higher viability than those at 4 °C when storage expanded to 12 months, but some of these

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (31170626)

\*\* 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: wenb@xtbg.org.cn

收稿日期: 2014-02-24, 2014-04-10 接受发表

作者简介: 计明月 (1988-) 女, 硕士研究生, 主要从事植物种质资源保存工作。E-mail: isabella0410@163.com

seeds were found germinating during 15 °C storage at the third month, and more and more germinated seeds there were as media moisture content and storage duration increasing; 2 h flash drying to moisture content 7% let more than 90% excised embryos survive freezing-thaw treatment and one-year's cryo-storage made no difference to their post thaw survival, indicating that it is feasible to cryopreserve *Podocarpus nagi*. These findings can be referred to short- and long-term conservation of recalcitrant seeds.

**Key words:** Recalcitrant seeds; *Podocarpus nagi*; Desiccation tolerance; Moist storage; Partially-dried storage; Cryopreservation; Germplasm conservation

竹柏 (*Podocarpus nagi*) 是罗汉松科 (Podocarpaceae) 罗汉松属 (*Podocarpus*) 多年生常绿乔木, 为古老的裸子植物, 起源于距今约 1 亿 5 500 万年前的中生代白垩纪, 被人们称为“活化石”。竹柏因叶脉平行似竹叶而得名, 叶形奇异, 终年苍翠, 高可达 20 m, 树干修直, 形态优美, 叶茂荫浓, 抗病虫害能力强。竹柏原产于中国、日本等地, 喜温暖环境, 不耐湿亦不耐旱, 稍耐寒, 是优美的常绿观赏树木, 常作为景观树和行道树, 既可以在公园、庭园、住宅小区、街道等地段内成片种植, 也可以与其它常绿落叶树种混合栽种, 广泛种植于热带、亚热带地区。

根据林业生产的经验, 竹柏种子不耐贮藏, 需要随采随播 (曹人智, 2001), 推测竹柏种子可能属于顽拗性种子 (Farrant 等, 1985; Lin 和 Huang, 1994)。顽拗性种子的概念最早由 Roberts (1973) 提出, 是指一类贮藏寿命不随温度与含水量降低而按种子生命力方程 (Roberts, 1972) 延长的种子, 具有对低温和脱水敏感、不耐贮藏的特点, 常规种子库的脱水处理和低温、干燥、密封保存不仅不能延长这类种子的寿命, 反而会加速种子的死亡 (文彬, 2008)。尽管如此, 我们对竹柏种子的贮藏特性仍缺乏了解, 比如, 竹柏种子的脱水耐性如何? 最低安全含水量是多少? 能否耐受低温? 林业生产上需要中短期贮藏种子, 常规方法贮藏的适宜条件是什么? 能贮藏多久? 通常, 对于生产顽拗性种子的植物, 超低温保存是种质资源长期离体贮藏的唯一途径。竹柏种子能否超低温保存? 如何进行超低温保存? 这些问题都亟待解决。

因此, 我们开展竹柏种子贮藏特性的研究, 有助于我们了解竹柏种子的脱水耐性和低温耐性, 确定其贮藏行为特征, 制定切实有效的中短期保存方法, 并探讨超低温保存方案, 这对于林业生产上因季节或运输的需要而进行中短期保存

种子, 提高育苗的出苗率, 以及长期保存种质资源, 具有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

实验所用的种子均于种子成熟季节采自云南省西双版纳傣族自治州勐腊县勐仑镇中国科学院西双版纳热带植物园人工栽培的植株, 采集时间为 2012 年 12 月。种子采收后立即将肉质外种皮去除, 装进聚乙烯袋并保存于 15 °C 待用。从种子采收到用于布置实验, 种子保存时间不超过一周。

### 1.2 实验方法

1.2.1 种子的脱水耐性实验 将去除了肉质外种皮的种子分为 9 份, 每份 108 粒, 然后按一层种子一层活性硅胶的方法将种子放入封闭容器中, 快速脱水 0 h、6 h、12 h、18 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h, 获得 9 个含水量梯度的种子, 每份随即取 8 粒种子测定含水量, 其余种子播种到 1% 琼脂中进行活力评价。

1.2.2 种子半干藏实验 按 Pritchard 等 (1995) 的方法设计实验, 研究含水量、贮藏温度和贮藏期 3 个因素对半干藏种子活力的影响。先把种子用活性硅胶快速脱水 0 h、6 h、12 h、18 h、24 h、36 h, 获得 6 个含水量梯度的种子, 测定脱水处理后的含水量及活力, 然后将余下的种子按 110 粒为一份, 用铝箔袋封装好, 置于 15 °C、4 °C、-20 °C 和 -70 °C 贮藏, 并分别在贮藏满 1 周、1 个月、3 个月、6 个月、9 个月和 12 个月之时, 从每个贮藏温度下取出不同含水量的种子各一袋, 待种子恢复到室温之后播种到 1% 琼脂上进行活力评价。

1.2.3 种子湿藏实验 参考 Wen (2009) 的方法, 将 50 g 已经烘干并冷却的珍珠岩放入容积为 500 mL 的塑料瓶中, 再分别加 30 mL、45 mL、60 mL、75 mL、90 mL 蒸馏水, 配成含水量为 60%、90%、120%、150%、180% 的珍珠岩。然后每瓶放入 108 粒竹柏种子, 振荡摇匀, 加盖但不拧紧, 分别贮藏于 15 °C 和 4 °C 的条件下, 待贮藏 1 周、1 个月、3 个月、6 个月、9 个月和 12 个月之后, 从每个贮藏温度取出不同含水量的种子各一瓶, 其中 8 粒种子用于检测含水量变化, 100 粒种子播种到 1% 琼脂做活力检测。

### 1.2.4 离体胚的脱水和超低温保存

离体胚的准备 新采收的种子先去掉外种皮, 用自来水冲洗干净, 然后在超净工作台上用 75% 的酒精灭菌 3 min, 无菌的去离子水清洗 2 次, 每次 5 min。再用 0.1% 的次氯酸钠灭菌 30 min, 无菌的去离子水漂洗 5 次, 每次 5 min。小心切开种子, 分开胚乳获取完整胚, 将胚存放在无菌培养皿中的湿滤纸上待用。

离体胚的脱水和超低温保存 离体胚的脱水参照 Wen (2009) 的方法, 在超净工作台内将胚摆放在用铝箔片做成的直径 2 cm 的小碟中, 然后将小碟放到盛满活性硅胶的密闭容器中, 在室温条件 (25~28 °C) 下脱水不同的时间。

第一个超低温保存实验是研究含水量对超低温保存结果的影响。将离体胚脱水 0~12 h, 得到 10 个含水量梯度, 每个梯度 80 粒胚, 其中 40 粒用于超低温保存, 40 粒作为对照。用于超低温保存的胚, 每 10 粒装入一冷冻管, 快速投入到液氮中, 1 周后取出并迅速投入到 40 °C 的温水中快速解冻 60 s, 然后接种到培养基上。用于对照的胚在经过脱水处理后直接进行胚培养。

第二个超低温保存实验是研究长期液氮贮藏对离体胚活力的影响。用上述方法把离体胚处理到 3 个含水量梯度 (脱水时间为 2、4、7 h), 装入冷冻管, 投入液氮中保存, 分别于超低温贮藏 1、3、6、9、12 个月取出不同含水量的胚各 40 粒进行活力评价。

1.2.5 含水量测定 使用 8 个重复, 每个重复含单粒种子或 10 粒胚, 分别测定种子或胚的含水量。按国际种子检验协会 (ISTA, 1985) 推荐的测量油料种子含水量的方法, 把样品置于鼓风烘箱中在  $103 \pm 2$  °C 烘干  $17 \pm 1$  h, 以样品烘干前后的重量变化计算含水量 (%)。

含水量 (%) = (鲜重 - 干重) / 鲜重  $\times 100\%$ 。

1.2.6 种子活力评价 每 20 粒种子播种到装有 1% 琼脂的 12 cm 的培养皿中为 1 个重复, 每处理 5 个重复。种子置于恒温萌发箱中, 在  $25 \pm 1$  °C, 每日 14 h 光照, 光强为  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  条件下萌发。每周检查一次种子萌发情况, 持续 6 个月。以胚根伸出种皮至少 5 mm 记录为萌发, 以第一片真叶长成记录为成苗。不萌发种子在实验结束时切开种子查看胚是否变软、腐烂。

成苗率 (%) = 成苗的种子数 / 供试种子数  $\times 100\%$ 。

1.2.7 离体胚活力评价 采用 Chin (1988) 改进的 MS 培养基, 该培养基包含了 MS 培养基的基盐, 每升添加 30 g 蔗糖, 0.1 mg NAA 和 0.1 mg BAP, 用 8 g 琼脂固化。在 121 °C 高压灭菌锅灭菌 15 min 后分装到直径 5.5 cm 的一次性塑料培养皿中。每培养皿约 10 mL 培养基, 接种 5 粒胚, 置于  $25 \pm 1$  °C、相对湿度约 50% 的培养房中培养, 每周观测一次, 至少观测 6 个月。胚有明显生长记录为存活。

存活率 (%) = 成活的胚数 / 供试胚数  $\times 100\%$ 。

### 1.3 数据的统计分析

根据 5 个重复, 每个重复含 20 粒种子的萌发实验结果计算种子成苗率和存活率的均值和标准差, 根据 8 个重复, 每个重复含 5 粒胚的胚培养实验结果计算离体胚存活率的均值和标准差。成苗率和存活率在经过反正弦转换之后做方差分析, 并在  $\alpha = 0.05$  水平上做处理间的多重比较。

## 2 结果

### 2.1 竹柏种子的脱水耐性

将新采收的竹柏种子用活性硅胶快速脱水 0 h、6 h、12 h、18 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h, 其含水量由  $(35.78 \pm 0.67)\%$  下降到  $(6.26 \pm 0.48)\%$ , 成苗率由  $(98.33 \pm 1.05)\%$  下降到  $(6.25 \pm 1.95)\%$ , 存活率由  $(98.33 \pm 1.05)\%$  下降到  $(11.25 \pm 1.95)\%$ 。明显地, 在脱水处理 24 h 的地方存在一个拐点, 含水量在  $(16.86 \pm 0.73)\%$  及以上的种子其成苗率和存活率并没有明显变化, 而含水量下降到  $(13.42 \pm 0.69)\%$  以后, 成苗率和存活率显著下降, 且随着含水量的每一次降低成苗率和存活率都有明显的下降, 当含水量为  $(6.26 \pm 0.48)\%$  时成苗率仅为  $(6.25 \pm 1.95)\%$ 。说明竹柏种子对脱水处理敏感, 其最低安全含水量在  $(16.86 \pm 0.73)\%$  附近 (图 1)。

### 2.2 竹柏种子的半干燥

将竹柏种子用硅胶快速脱水 0、6、12、18、

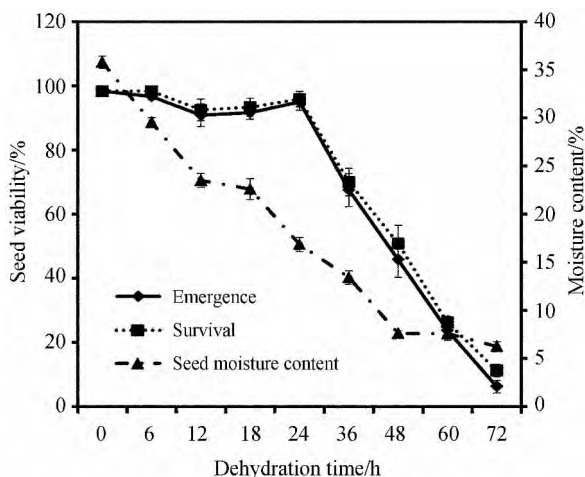


图 1 脱水处理对竹柏种子含水量、成苗率和存活率的影响

Fig. 1 Emergence and survival of *Podocarpus nagi* seeds and their moisture contents after desiccation treatment

24 和 36 h 后密封在铝箔袋中分别贮藏在-70 ℃、-18 ℃、4 ℃和 15 ℃条件下。在 12 个月的贮藏期内,发现种子的含水量、贮藏温度和贮藏时间均对种子的生命力有显著的影响(表 1),且三者间的独立与交互作用都极显著(表 2)。

零下低温贮藏对竹柏种子来说是致命的,在-18 ℃或-70 ℃条件下,即使只是贮藏 1 周,也没有种子能够存活下来(数据未列出)。在 4 ℃和 15 ℃条件下贮藏的竹柏种子,萌发率均随贮藏时间的延长而下降,但由于含水量和贮藏温度不同,萌发率下降的速度也不一样。在 15 ℃贮藏的种子,以未脱水的种子(对照)萌发率保存最好,含水量越低,萌发率下降越快;贮藏 3 个月,初始含水量的种子保存有近四成的发芽率,其余处理仅临界含水量的种子有 15%的萌发率;6 个月后,贮藏于 15 ℃的种子无一萌发。贮藏于 4 ℃的竹柏种子,萌发率保存明显优于 15 ℃贮藏的种子,但亦以临界含水量以下的种子萌发率下降最快;在不超过 3 个月的贮藏期内,除低于临界含水量的种子外,其余含水量的种子萌发率降低不多,且含水量越高,萌发率变化越小;贮藏到 6 个月时,初始含水量的种子萌发率仍高达 98%,临界含水量的种子有六成以上可以萌发成苗;贮藏期延长到 9 个月时,临界含水量的种子萌发率最高,仍有一半以上的种子萌发;到 12 个月时,4 ℃贮藏的种子亦基本全部死亡。

因此,竹柏种子可以在零上低温以半干藏的方式贮藏,且 4 ℃贮藏明显优于 15 ℃贮藏,在 4 ℃条件下,贮藏 6 个月的种子以初始含水量的种子萌发率最高,而贮藏 9 个月的种子以临界含水量的种子萌发率最高。

2.3 竹柏种子的湿藏

本实验研究了在 12 个月的贮藏期内,15 ℃和 4 ℃两个贮藏温度及珍珠岩贮藏介质的含水量对种子活力的影响。方差分析表明,在 9 个月的贮藏期内,贮藏温度和贮藏介质的含水量对竹柏种子的活力没有显著影响(贮藏时间:  $F = 3.421$ ,  $P = 0.066$ ; 贮藏介质含水量:  $F = 0.558$ ,  $P = 0.693$ ); 不论珍珠岩含水量的高低,也不管是在 15 ℃还是在 4 ℃贮藏,只要贮藏期不超过 9 个月,种子的成苗率均在 90%以上。但贮藏到

表 1 半干藏过程中竹柏种子的生命力变化  
Table 1 Changes in viability of partially-dried *Podocarpus nagi* seeds

| 种子含水量<br>Seed MC/% | 温度<br>Temperature/℃ | 成苗率 Viability/% |                 |                |                |                |               |           |
|--------------------|---------------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|-----------|
|                    |                     | 0 month         | 0.25 month      | 1 month        | 3 month        | 6 month        | 9 month       | 12 month  |
| 34.75 ± 0.720      | 15                  | 98.33 ± 1.05a   | 95.46 ± 1.25a   | 92.00 ± 3.74a  | 37.06 ± 3.38a  | 0              | 0             | 0         |
|                    | 4                   |                 | 100.00a         | 100.00a        | 96.00 ± 1.87a  | 98.00 ± 1.22a  | 30.85 ± 9.64b | 2 ± 1.83a |
| 29.55 ± 0.706      | 15                  | 96.67 ± 1.05a   | 97.00 ± 1.22a   | 96.00 ± 2.92a  | 0b             | 0              | 0             | 0         |
|                    | 4                   |                 | 96.11 ± 1.55abc | 95.09 ± 1.58ab | 94.5 ± 2.55a   | 33.40 ± 4.01cd | 7.00 ± 3.39c  | 1 ± 0.91a |
| 21.67 ± 0.9912     | 15                  | 90.83 ± 3.52a   | 98.10 ± 1.17a   | 88.82 ± 2.35ab | 0b             | 0              | 0             | 0         |
|                    | 4                   |                 | 95.00 ± 3.87ab  | 94.23 ± 1.92ab | 89.84 ± 3.59a  | 60.00 ± 5.24b  | 20.00 ± 3.54c | 1 ± 0.91a |
| 21.35 ± 1.1018     | 15                  | 91.67 ± 2.11a   | 91.00 ± 3.32ab  | 91.00 ± 1.87a  | 0b             | 0              | 0             | 0         |
|                    | 4                   |                 | 98.33 ± 1.67ab  | 90.00 ± 5.24ab | 80.33 ± 6.53a  | 53.00 ± 6.24bc | 21.00 ± 5.34c | 5 ± 2.04a |
| 18.33 ± 0.6624     | 15                  | 95.00 ± 2.58a   | 87.56 ± 5.79ab  | 83.00 ± 5.15ab | 15.00 ± 8.80ab | 0              | 0             | 0         |
|                    | 4                   |                 | 91.00 ± 1.87b   | 89.82 ± 3.48b  | 88.12 ± 6.36a  | 66.00 ± 7.31b  | 56.00 ± 4.85a | 1 ± 0.91a |
| 12.55 ± 3.4836     | 15                  | 67.50 ± 5.12b   | 72.00 ± 6.82b   | 61.48 ± 9.01b  | 0b             | 0              | 0             | 0         |
|                    | 4                   |                 | 62.00 ± 4.06c   | 45.00 ± 4.47c  | 33.00 ± 4.06b  | 15.00 ± 3.54d  | 6.00 ± 2.92c  | 0a        |

Notes: 1) Data for seeds stored at -18 ℃ and -70 ℃ is not shown, for none germinated. MC (MC=Moisture content, m=month, the same for the following tables) values are expressed as mean ± SE of 8 replicates of seeds. Viability values are means ± SE of the germination percentage of 5 replicates of 20 seeds; 2) Different small letters in a column indicate significant difference in viability between seeds at various moisture levels after the same storage duration. ANOVA was conducted for seed viability between moisture with same storage duration (n=5, P<0.05)

表 2 半干藏过程中贮藏时间、贮藏温度和含水量对种子生命力影响的方差分析  
Table 2 ANOVA analysis of storage time ,storage temperature and moisture content on seed viability for partially-dried storage (  $P<0.05$ )

| Source *   | SS           | df | MS          | F        | Sig.   |
|------------|--------------|----|-------------|----------|--------|
| Ti         | 348 849. 932 | 6  | 58 141. 655 | 739. 051 | 0. 000 |
| Te         | 44 377. 142  | 1  | 44 377. 142 | 564. 087 | 0. 000 |
| MC         | 30 031. 889  | 5  | 6 006. 378  | 76. 348  | 0. 000 |
| Ti* Te     | 62 045. 833  | 6  | 10 340. 972 | 131. 446 | 0. 000 |
| Ti* MC     | 12 930. 354  | 30 | 431. 012    | 5. 479   | 0. 000 |
| Te* MC     | 6 855. 938   | 5  | 1 371. 188  | 17. 429  | 0. 000 |
| Ti* Te* MC | 13 222. 815  | 30 | 440. 760    | 5. 603   | 0. 000 |

\* Ti: Storage Time; Te: Storage Temperature; MC: Moisture content

12 个月时,4℃贮藏种子的萌发率明显低于 15℃贮藏的种子(贮藏时间:  $F=9.648$ ,  $P<0.001$ ; 贮藏温度:  $F=20.348$ ,  $P<0.001$ )(表 3)。

虽然,竹柏种子在 15℃条件下贮藏活力较高,但贮藏 3 个月后取出时,发现部分种子已经开始萌发,萌发率从 5%至 25%,珍珠岩含水量越高,贮藏时间越长,萌发的种子就越多,贮藏到 12 个月时,在含水量 180%珍珠岩中贮藏的种子 85%已经成苗(表 4)。而 4℃贮藏条件下,无论珍珠岩含水量的高低,贮藏 12 个月仍然没有发现有种子在贮藏期间萌发。

所以,若贮藏期不超过 9 个月,湿藏竹柏种子的萌发率不会发生明显的改变,且在 4℃贮藏可以避免发生贮藏期间种子萌发的情况;若在 15℃贮藏,降低珍珠岩的含水量也可以减少贮藏期间种子萌发情况的发生。

2.4 离体胚的脱水和超低温保存

第一个实验是研究胚的含水量与胚存活的关系。

根据实验结果判断,离体胚对脱水处理表现出很高的耐性,即便是在活性硅胶中处理 12 h 脱水到  $(3.04 \pm 0.20)\%$ ,胚的存活率也没有发生明显的变化(图 2)。因此,竹柏种子的离体胚具有比整粒种子高得多的脱水耐性。

竹柏胚的初始含水量高达 56%,直接投入液氮中基本都被冻死,即使少数幸存也只是部分细胞存活。冷冻前进行脱水处理就可以很好的解决冷冻伤害这一问题。用硅胶脱水 1 h 再投入液氮,即可以让 80%的胚存活,尽管无一成苗,但都长出了明显的愈伤组织;冷冻前脱水 2 h 到含水量 7%,胚的存活率可以提高到 90%。离体胚的快速脱水是超低温保存成功的关键,胚的含水量从 10%到 5%,每次降低都可以进一步提高解冻后离体胚的存活率,脱水 3 h 是最佳的处理时间,冻融处理后胚的存活率达到 100%。脱水时间超过 3 h,解冻后胚的存活率又有所下降,但仍高于 90%(图 2)。

表 3 湿藏过程中竹柏种子的生命力变化  
Table 3 Seed viability under moist storage

| 贮藏温度<br>Temperature<br>/℃ | 珍珠岩<br>含水量<br>Medium MC/% | 种子成苗率 Seed viability /% |                |                |                |                |             |
|---------------------------|---------------------------|-------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------|
|                           |                           | 0. 25 month             | 1 month        | 3 month        | 6 month        | 9 month        | 12 month    |
| 15                        | 60                        | 97. 00 ± 1. 22          | 98. 00 ± 1. 22 | 99. 00 ± 1. 00 | 81. 43 ± 8. 40 | 99. 00 ± 1. 00 | 98 ± 2. 00  |
|                           | 90                        | 99. 00 ± 1. 00          | 93. 00 ± 3. 74 | 99. 00 ± 1. 00 | 94. 00 ± 2. 92 | 99. 00 ± 1. 00 | 76 ± 10. 30 |
|                           | 120                       | 99. 05 ± 0. 95          | 100. 00        | 95. 00 ± 3. 87 | 92. 00 ± 4. 90 | 99. 00 ± 1. 00 | 100. 00     |
|                           | 150                       | 97 ± 3. 00              | 96. 36 ± 3. 64 | 91. 00 ± 4. 85 | 100. 00        | 97. 00 ± 2. 00 | 98 ± 2. 00  |
|                           | 180                       | 98 ± 1. 22              | 97. 00 ± 1. 22 | 93. 00 ± 5. 83 | 96. 67 ± 3. 33 | 99. 00 ± 1. 00 | 100. 00     |
| 4                         | 60                        | 98. 00 ± 1. 22          | 97. 00 ± 3. 00 | 94. 00 ± 2. 92 | 91. 10 ± 1. 86 | 99. 00 ± 1. 00 | 83 ± 8. 46  |
|                           | 90                        | 97. 00 ± 1. 22          | 99. 00 ± 1. 00 | 93. 00 ± 4. 64 | 96. 00 ± 1. 87 | 99. 00 ± 1. 00 | 69 ± 9. 54  |
|                           | 120                       | 92. 27 ± 2. 85          | 98. 00 ± 1. 22 | 93. 52 ± 2. 89 | 96. 00 ± 2. 92 | 91. 00 ± 4. 85 | 59 ± 12. 79 |
|                           | 150                       | 99. 00 ± 1. 00          | 99. 00 ± 1. 00 | 95. 89 ± 1. 89 | 96. 00 ± 1. 87 | 97. 00 ± 3. 00 | 65 ± 13. 60 |
|                           | 180                       | 93. 00 ± 3. 39          | 98. 00 ± 1. 22 | 99. 00 ± 1. 00 | 93. 00 ± 1. 22 | 91. 00 ± 5. 57 | 76 ± 7. 81  |

表 4 15℃下湿藏过程中竹柏种子的萌发  
Table 4 Early germination of *Podocarpus nagi* seeds under moist storage at 15℃

| 珍珠岩含水量<br>Medium MC/% | 种子成苗率 Seed viability/% |         |         |         |         |          |
|-----------------------|------------------------|---------|---------|---------|---------|----------|
|                       | 0. 25 month            | 1 month | 3 month | 6 month | 9 month | 12 month |
| 60                    | 0                      | 0       | 5       | 4       | 17      | 19       |
| 90                    | 0                      | 0       | 19      | 25      | 43      | 46       |
| 120                   | 0                      | 0       | 11      | 41      | 50      | 61       |
| 150                   | 0                      | 0       | 24      | 61      | 46      | 81       |
| 180                   | 0                      | 0       | 25      | 74      | 63      | 85       |

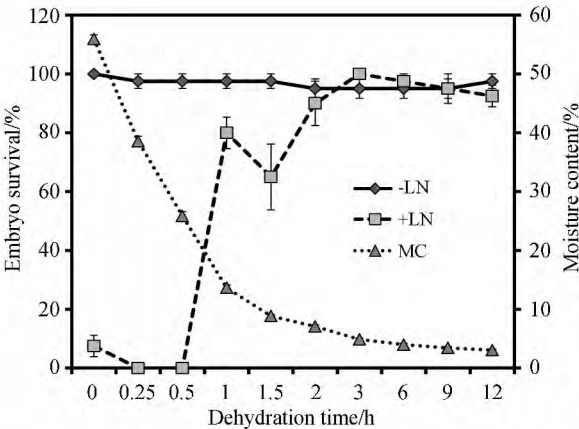


图 2 脱水及超低温处理对竹柏胚存活率的影响  
Fig. 2 Effects of desiccation and cryo-treatment on survival of excised *Podocarpus nagi* embryos

第二个实验是研究长期液氮保存对竹柏离体胚活力的影响。取含水量在 7% 到 4% 之间 3 个梯度（分别对应脱水 2 h、4 h 和 7 h）的胚，投入液氮中贮藏不同的时间，调查解冻后胚的存活率变化。结果表明：解冻后 90% 的胚都长出了愈伤组织，在液氮中保存 1 年的胚与只保存 1 周的相比，存活率并没有发生显著的改变（数据未列出）；说明竹柏离体胚的超低温保存不受贮藏期的影响，在液氮中长期保存竹柏种质资源是可行的。

3 讨论

竹柏种子对脱水和低温处理都很敏感，不能按常规方法在种子库中长期保存，即先在 15℃ 和 15% 相对湿度脱水到平衡含水量，然后贮藏在 -18℃ 及以下温度；半干藏的种子活力保存不超过一年，湿藏在 15℃ 的种子 3 个月即开始在贮藏过程中萌发，湿藏在 4℃ 的种子一年后观察

到了明显的活力下降。落果时含水量高、对低温和脱水敏感、不耐贮藏等这些都是顽拗性种子的典型特点（Roberts，1973），据此可以判定本研究中所用的竹柏种子为顽拗性种子。

顽拗性种子的贮藏目前仍然是亟待解决的重大科学问题。生产实践中因为种子成熟期与播种期不一致或者因为种源地与种子播种地相距遥远需要长途运输时，均需要中短期贮藏种子。竹柏种子在秋天成熟并落果，虽然部分种子可以在树上宿存至次年二月，但宿存的种子绝大部分已经不能萌发（Wang 等，2004）。因此，一般需要在种子成熟后的十月至十二月份采集种子，但是播种却在第二年春天的三四月份，生产上如何贮藏竹柏种子就显得很重要。

林业生产上常用半干藏的方法贮藏顽拗性种子，并有一些成功的实例，如橡胶种子用半干藏法贮藏 13 个月后仍有约 20% 的萌发率（Noor 和 Chin，1989），咖啡（Selmar 等，2008），南洋杉（Tompsett，1984）和龙脑香（Tompsett，1987）用此法贮藏也延长了寿命。该方法的关键点是确定最适宜的种子含水量和贮藏温度。本研究中的竹柏种子，其最低安全含水量在 16.86% 左右。除了在 -18℃ 和 -70℃ 下贮藏的种子完全丧失生命力而失去贮藏价值外，在 15℃ 和 4℃ 这两个温度下贮藏的种子均可以中短期保持生命力，其活力都随贮藏时间的增长而降低。未经脱水处理的种子在 4℃ 贮藏半年，成苗率仍高达 98%，脱水到 18% 的种子，4℃ 贮藏 9 个月后，成苗率仍然高达 56%。然而当贮藏温度为 15℃ 时，即使只是贮藏 3 个月，竹柏种子的成苗率已经非常低，贮藏 6 个月的种子已全部死亡。我们的实验表明，半干藏可以作为顽拗性竹柏种子短期贮藏的一种方法，4℃ 低温保存可以延长贮藏期，且根据竹柏

种子的脱水耐性对种子进行适度的脱水处理,有助于降低种子的代谢强度,延长其贮藏寿命。

生产上另一种常用的中短期贮藏顽拗性种子的方法是湿藏。通常的做法是把种子跟珍珠岩、蛭石、锯末、椰糠、木炭或湿沙等持水介质混合在一起,保持种子含水量相对稳定,避免贮藏期间的脱水伤害。同样需要把种子贮藏在尽可能低但又不至于导致寒害发生的温度下,使种子的劣变减缓到最小。可以参考 Pritchard 等 (1995) 贮藏南洋杉种子的方法,通过计算种子萌发速率的基础温度确定种子湿藏的适宜温度。据报道,早在 1943 年 Marrero 等就证明用控制温度和湿度的办法,可延长多种热带植物种子的寿命。而后,龙脑香 (宋学之, 1982), 海南坡垒 (Song 等, 1984) 等植物的种子也用湿藏的方法延长了种子的贮藏期。我们将竹柏种子与不同含水量的珍珠岩混合后,贮藏在 15℃ 和 4℃ 两个温度。结果表明,在 15℃ 情况下,因种子生命活动旺盛,容易在贮藏期间发芽而失去保存价值。将贮藏 3 个月的种子取出,发现已经有竹柏种子开始大量萌发,之后相当于幼苗贮藏。但是,我们注意到,降低贮藏介质的含水量,可以有效减少贮藏过程中种子的萌发。而在 4℃ 情况下,即便贮藏 12 个月,也没有发现种子在贮藏过程中萌发。因此,用湿藏的方法保存竹柏种子,必须调节介质的含水量,并且控制贮藏温度。

半干藏虽然可以适当延长竹柏种子的寿命,但是其保存时间仍然很短。湿藏虽然取得了比半干藏好的效果,但是,此方法增加了保存材料的重量和体积,并可能导致种子在贮藏期间萌发。竹柏种子的湿藏和半干藏均以 4℃ 贮藏优于 15℃ 贮藏,这可能跟该物种原产于亚热带地区、种子具有一定的低温耐性有关; 热带起源的顽拗性种子,如坡垒,其安全含水量在 33%~38%,贮藏温度在 15~20℃ 时合适,当含水量下降到 20% 时全部死亡 (陈青度等, 1982); 红椎种实在安全含水量 32%~37%, 温度在 15~20℃ 时贮藏合适,过高或过低的含水量或温度都不利其贮藏 (宋学之等, 1992)。

因此,半干藏和湿藏两种方法,都只能作为顽拗性竹柏种子的中短期贮藏手段,而超低温保存成为长期贮藏竹柏种质资源的唯一选择

(Engelmann, 2000, 2004; Berjak 和 Pammenter, 2001, 2004, 2014; Pammenter 和 Berjak, 2014)。有几种温带顽拗性种子和亚正常性种子,在超低温保存 10 年后仍保持 80% 以上的存活率 (Pence, 2004)。本研究发现,竹柏离体胚的脱水耐性明显高于整粒种子,且在脱水到含水量低于 15% 后就可以耐受超低温处理,超低温保存 1 年后其活力没有发生明显的变化。虽然在本实验中可能是因为培养基或培养条件不理想,我们没有能够把竹柏离体胚,包括液氮冻存和未经过冻融处理的离体胚培养成苗,但我们的研究证实超低温长期保存顽拗性竹柏种子是有希望的,这就为顽拗性竹柏种子的长期保存指明了方向。

#### 4 小结

竹柏种子的最低安全含水量为 (16.86 ± 0.73)%, 贮藏过程中保持竹柏种子含水量不低于最低安全含水量,湿藏和半干藏均可以达到中短期保存种子的目的,湿藏的种子可以保持较高的生命力但易于在贮藏期间萌发,而半干藏的种子避免了贮藏期间萌发但种子活力降低迅速,这两种方法均以 4℃ 贮藏效果优于 15℃。

离体胚脱水到 7% 及以下就可以耐受超低温冻融处理,而且离体胚在液氮中保存一年后存活率没有发生变化。超低温保存是长期保存竹柏种质资源的唯一方法,下一步需要优化竹柏离体胚培养的条件,实现超低温保存后离体胚的恢复成苗。

#### (参 考 文 献)

- 曹人智, 2001. 国家珍稀保护植物 [J]. 农技服务, 12: 19
- 陈青度, 宋学之, 杨军等, 1982. 不同温度贮藏对坡垒种子活力的影响 [J]. 热带林业科技, 1: 47—50
- 宋学之, 刘文明, 1992. 红椎种实主要储藏条件的研究 [J]. 林业科学研究, 5 (2): 134—141
- 宋学之译 (Tang HT and Tamari C, 1973), 1982. 龙脑香科一些树种种子的描述与储藏实验 (The Malaysian Forester) [J]. 热带林业科技, 2: 59—61
- Berjak P, Pammenter NW, 2001. Seed recalcitrance: current perspectives [J]. *South African Journal of Botany*, 67: 79—89
- Berjak P, Pammenter NW, 2004. Biotechnological aspects of non-orthodox seeds: an African perspective [J]. *South African Journal of Botany*, 70: 102—108

- Berjak P , Pammenter NW , 2014. Cryostorage of germplasm of tropical recalcitrant-seeded species: approaches and problems [J]. *International Journal of Plant Sciences* , **175** ( 1 ) : 29—39
- Chin HF , Krishnapillay B , Alang ZC , 1988. Media for embryo culture of some tropical recalcitrant species [J]. *Pertanika* , **11** : 357—363
- Engelmann F , 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources [A]. // Engelmann F , Takagi H eds. , *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application* [M]. Japan: Japan International Research Center for Agricultural Sciences , **8** : 20
- Engelmann F , 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects [J]. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant* , **40** ( 5 ) : 427—433
- Farrant JM , Berjak P , Pammenter NW , 1985. The effect of drying rate on viability retention of recalcitrant propagules of *Avicennia marina* [J]. *South African Journal of Botany* , **51** : 432—438
- International Seed Testing Association ( ISTA ) , 1985. International rules for seed testing [J]. *Seed Science and Technology* , **13** : 356—513
- King MW , Roberts EH , 1979. *The Storage of Recalcitrant Seeds—Achievement and Possible Approaches: A Report on a Literature Review Carried Out for the International Board for Plant Genetic Resources* [M]. Rome: International Board for Plant genetic Resources
- Lin TP , Huang NH , 1994. The relationship between carbohydrate composition of some tree seeds and their longevity [J]. *Journal of Experimental Botany* , **45** ( 9 ) : 1289—1294
- Marrero J , 1943. A seed storage study of some tropical hardwoods [J]. *Caribbean Forester* , **4** : 99—106
- Normah MN , Vengadasalam M , 1992. Effects of moisture content of cryopreservation of *Coffea* and *Vigna* seeds and embryos [J]. *Cryoletters* , **13** ( 3 ) : 199—208
- Pammenter NW , Berjak P , 2014. Physiology of desiccation-sensitive ( recalcitrant ) seeds and the implications for cryopreservation [J]. *International Journal of Plant Sciences* , **175** ( 1 ) : 21—28
- Pence VC , 1992. Desiccation and survival of *Aesculus* , *Castanea* , and *Quercus* embryo axes through cryopreservation [J]. *Cryobiology* , **29** ( 3 ) : 391—399
- Pence VC , 2004. In vitro growth of embryo axes after long-term storage in liquid nitrogen [A]. // Smith RD , Dickie JB , Linington SL et al. eds. , *Seed Conservation: Turning Science into Practice* [M]. Kew: Royal Botanic Gardens , 483—492
- Pritchard HW , Tompsett PB , Manger K et al. , 1995. The effect of moisture content on the low temperature response of *Araucaria hunsteinii* seed and embryos [J]. *Annals of Botany* , **76** : 79—88
- Roberts EH , 1972. Storage environment and the control of viability [A]. // Roberts EH ed. , *Viability of Seeds* [M]. Chapman and Hall LTD , 14—58
- Roberts EH , 1973. Predicting the storage life of seeds [J]. *Seed Science and Technology* , **1** : 499—514
- Selmar D , Bytof G , Knopp SE , 2008. The storage of green coffee ( *Coffea arabica* ) : decrease of viability and changes of potential aroma precursors [J]. *Annals of Botany* , **101** : 31—38
- Song XZ ( 宋学之 ) , Chen QD ( 陈青度 ) , Wang DF ( 王东馥 ) et al. , 1984. A study on the principal storage conditions of *Hopea hainanensis* seeds [J]. *Scientia Silvae Sinicae* ( 林业科学 ) , **20** : 225—236
- Tompsett PB , Pritchard HW , 1998. The effect of chilling and moisture status on the germination , desiccation tolerance and longevity of *Aesculus hippocastanum* L. seed [J]. *Annals of Botany* , **82** : 249—261
- Wang XF , Zhao T , Yan M et al. , 2004. Desiccation and storage of *Vatica astrotricha* , *Hopea hainanensis* , *Podocarpus nagi* and *Acmena acuminatissima* seeds [A]. // Sacandé M , Jøker D , Dulloo ME et al. eds. , *Comparative Storage Biology of Tropical Tree Seeds* [M]. Rome , Italy: International Plant Genetic Resources Institute , 165—173
- Wen B ( 文彬 ) , 2008. On the compound quantitative characteristic traits of seed recalcitrance [J]. *Acta Botanica Yunnanica* ( 云南植物研究 ) , **30** ( 1 ) : 76—88
- Wen B , 2009. Storage of recalcitrant seeds: a case study of the Chinese fan palm , *Livistona chinensis* [J]. *Seed Science and Technology* , **37** : 167—179