

荔枝和龙眼种子胚轴的脱水及贮存*

夏清华** 陈润政 傅家瑞

(中山大学生物系, 广州 510275)

摘 要

新采收的荔枝和龙眼种子的离体胚轴, 在 pH4.8—8.0 的 WPM 培养基中均可正常生长成苗, 加入 KT 和 NAA 对胚轴的生长有一定的抑制作用。荔枝和龙眼种子离体胚轴的临界含水量分别为 30% 和 23%, 低于此阈值时, 生活力迅速下降, 且培养 25 天不能成苗。经短期贮存的荔枝和龙眼种子离体胚轴生活力下降很快, 其中脱水的较未脱水的胚轴下降快, 且贮存后的胚轴接种后易感染。脱水至临界含水量的龙眼离体胚轴经液氮贮存后约有 25—50% 的存活率, 荔枝胚轴则不能存活。

关键词: 胚轴; 荔枝; 龙眼; 含水量; 脱水; 贮存

顽拗性种子(recalcitrant seeds)不耐干燥和低温, 寿命很短, 难贮藏^[14], 一般的保湿贮藏方法难达到种质保存的目的。荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)和龙眼(*Euphoria longan* Steud.)种子为顽拗性种子^[9, 10], 于室内通风处其寿命一般只有几天^[3, 4]。Ray 等用水藏法将荔枝种子的发芽力从 5 天延至 15 天^[13]。张北壮等用聚乙烯袋保湿贮藏荔枝和龙眼种子, 100 天后分别有 36% 和 87.5% 的发芽率^[3], 但这仍远达不到种质资源保存的要求。利用超低温(液氮-196℃)保存植物组织、器官已有不少成功的报道^[1, 2, 6]。保存顽拗性种质最有希望的途径是应用液氮贮存^[15, 16]。木菠萝、橡胶等顽拗性种子离体胚经液氮贮存后有一定的存活率^[7, 12]。本文对荔枝和龙眼种子的离体胚轴的培养条件、耐脱水力、零下低温及超低温贮存作了初步的探讨。

材料与方 法

一、试验材料

供试验的荔枝和龙眼购于广州市赤岗果场, 品种分别为“淮枝”和“乌圆”。

二、试验方法

胚轴的脱水 采用常压硅胶法和减压硅胶法对离体胚轴脱水。常压硅胶脱水系将

* 国家自然科学基金资助课题, 联合国国际植物遗传资源委员会(FAO/IBPGR)资助项目

** 现在广东省农业厅种子总站工作

刚从新鲜种子取出的胚轴置于底部装有硅胶的干燥器中,于室温下密封脱水。减压硅胶脱水系将胚轴置于底部装有硅胶的真空干燥器中,接上真空泵抽气 10min 后(干燥器内压力为 140mmHg/cm²)于室温下快速脱水。离体胚轴于 105±2℃ 下烘 16h 后测其含水量(以鲜重为基础计算)。

胚轴的贮存 零上低温贮存时,将胚轴装于 10ml 带盖的玻璃管中密封后,于 5℃ 和 10℃ 下贮放。胚轴的超低温贮存采用直接降温和分步降温两种方法。直接法是将装有胚轴的玻璃管密封后插入液氮贮存;分步法是将装有胚轴的玻璃管密封后,先置于-18℃ 的冰箱中 30min 后,再插入液氮中贮放;采用加防冻剂进行液氮贮存时,将 2℃ 的防冻剂注入装有胚轴的玻璃管中,于 2℃ 下处理 30min 后再分别采用直接法和分步法进行液氮贮存。经液氮贮存 24h 后取出,采用 30℃ 的室温和 30℃ 的水浴分别解冻。

胚轴的培养 将解冻的胚轴、脱水的胚轴及新采收种子中的胚轴用 70% 乙醇消毒 5—10s,用无菌水洗净后于 WPM 培养基上接种培养;而零上低温贮存的胚轴,先用 70% 的乙醇消毒 5—10s,无菌水洗,再用 0.1% 的 HgCl₂ 消毒 5min,无菌水洗后于 WPM 培养基上接种培养。培养基的 pH 值为 5.8,培养温度为 25℃,光照强度为 1000 lx,光周期 12h。

试验结果

一、消毒方法对荔枝和龙眼种子离体胚轴培养效果的影响

荔枝和龙眼种子及胚轴采用三种方法消毒:(1)新采收的种子用 70% 乙醇消毒 5—10s,再用 0.1% HgCl₂ 消毒 10min,无菌水洗净,取胚轴,接种;(2)刚从种子取出或脱水几小时的胚轴用 70% 乙醇消毒 5—10s,再用 0.1% HgCl₂ 消毒 10min,无菌水洗净后接种;(3)胚轴用 70% 乙醇消毒 5—10s,用无菌水冲洗后接种。三种方法培养胚轴 12 天,生长均正常且基本上没有感染,因此,刚从种子取出的胚轴或脱水几小时的胚轴的消毒方法可简化,只要用 70% 的乙醇消毒 5—10s 均可,而经一段时间贮存的胚轴则要采用常规的消毒方法。

表 1 不同 pH 值对荔枝和龙眼种子离体胚轴在 WPM 培养基中生长的影响(培养 12 天)

Table 1 Effect of pH on the growth of lychee and longan embryonic axes culture in WPM medium for 12 days

pH	Length(cm)					
	4.8	5.4	5.8	6.4	7.0	8.0
Plumule of lychee	1.28±0.15	1.73±0.25	1.81±0.09	1.70±0.74	2.11±0.32	1.97±0.44
Radicle of lychee	2.75±0.29	2.65±0.09	3.40±0.25	3.64±0.63	4.05±0.28	3.88±0.44
Plumule of longan	2.22±0.80	2.48±0.34	2.87±0.29	3.06±0.43	2.61±0.62	2.90±0.47
Radicle of longan	6.00±0.45	6.10±0.37	5.93±0.07	6.30±0.25	5.98±0.40	5.75±0.28

二、新采收的荔枝和龙眼种子离体胚轴的培养

新采收的荔枝和龙眼种子离体胚轴在 pH4.8—8.0 的 WPM 培养基上培养 12 天,胚

轴和胚芽发生率均为 100%，生长正常(表 1)，培养 25 天均能正常成苗。荔枝以 pH7—8 较佳，龙眼对 pH 适应性较广。培养基加 KT 和 NAA，生长势被抑制，尤其以龙眼胚轴的表现较明显(表 2)；但培养 25 天后均能成苗。

表 2. NAA 和 KT 对荔枝和龙眼种子离体胚轴在 WPM 培养基中生长的影响(培养 11 天)

Table 2. Effect of NAA and KT on the growth of lychee and longan embryonic axes culture in WPM medium for 11 days

NAA/KT(mg/L)	Length(cm)			
	Control	0.2/1.0	0.5/1.0	0.5/0.5
Plumule of lychee	0.68±0.17	0.35±0.05	0.42±0.07	0.39±0.04
Radicle of lychee	2.73±0.36	1.92±0.16	1.80±0.21	2.01±0.18
Plumule of longan	2.24±0.34	0.43±0.10	0.38±0.20	0.41±0.20
Radicle of longan	5.20±0.64	1.51±0.13	1.35±0.16	1.53±0.30

三、脱水对荔枝和龙眼种子离体胚轴生长势的影响

新采收的荔枝和龙眼种子离体胚轴的含水量分别为 53.1% 和 49.1%。无论是采用硅胶脱水还是抽真空快速脱水，只要它们的含水量分别下降至 30% 和 23% 以下时，其生长势迅速下降(表 3 和表 4)，培养 25 天仍不能成苗(图 1 和图 2)，且有些胚根出现异常，胚根长出来时裂成两半(图 2 D-3 左边)。因此，荔枝和龙眼种子离体胚轴脱水的临界含水量分别为 30% 和 23%。

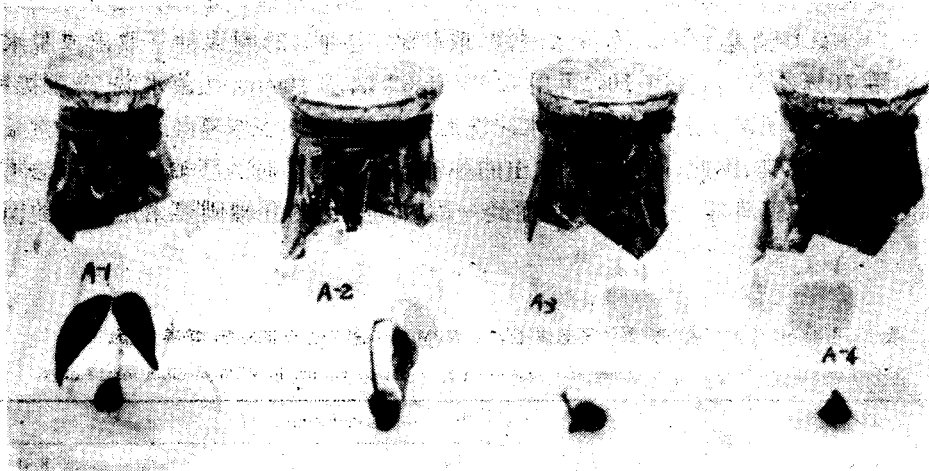


图 1. 真空脱水对外体培养荔枝种子胚轴生长的影响。从左到右胚轴的含水量分别为 40.0%，30.7%，23.4% 和 16.9% (培养 25 天)。

Fig. 1 Effect of vacuum desiccation on growth of embryonic axes of lychee seeds in vitro culture for 25 days. The moisture contents of embryonic axes from left to right were 40.0%, 30.7%, 23.4% and 16.9% respectively.

龙眼种子离体胚轴比荔枝的离体胚轴具有较强的耐脱水力及对脱水伤害的修复力。荔枝胚轴脱水至临界含水量时，培养 25 天均能成苗，但有些苗开始出现异常，有的只有一片较大的真叶(图 1 A-2)。延长培养时间至 40 天时，低于临界含水量的胚轴无一发育成苗，

而且不能进一步生长。具临界含水量的龙眼种子离体胚轴,培养 25 天均能正常成苗。低于临界含水量时,尽管培养 25 天不能成苗,但继续培养至 40 天时,含水量 17.6% 及 12.8% 的胚轴可部分发育成苗,其成苗率分别为 36.7% 和 20%。

两种脱水方式对脱水至含水量高于 30% 荔枝离体胚轴的培养效果相近。龙眼种子胚轴脱水则以减压硅胶快速脱水的效果较佳。采用减压硅胶法将龙眼种子胚轴的含水量降至 23.1%, 培养 20 天可全部成苗,而常压硅胶脱水至 23.5% 时,培养 20 天只有 66.7% 的成苗率,25 天时才达到 100%。

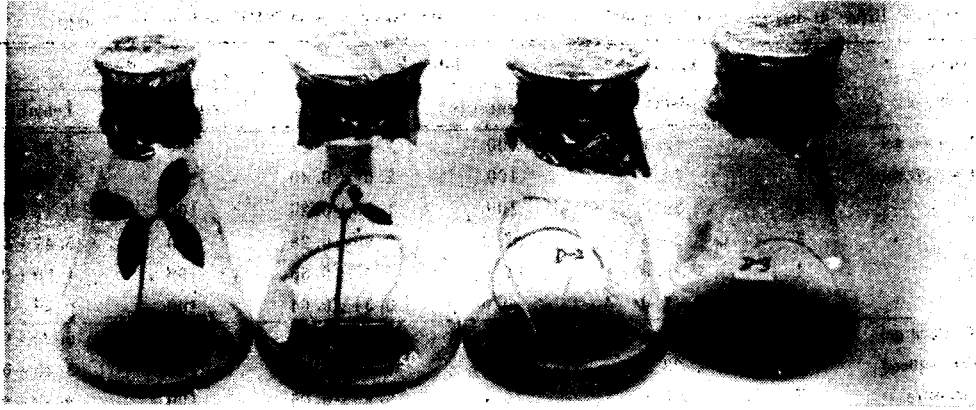


图 2 真空脱水对体外培养龙眼种子胚轴生长的影响。从左到右胚轴的含水量分别为 49.1%, 23.1%, 12.8% 和 7.0% (培养 25 天)。

Fig 2 Effect of vacuum desiccation on growth of embryonic axes of longan seeds in vitro culture for 25 days. The moisture contents of embryonic axes from left to right were 49.1%, 23.1%, 12.8% and 7.0% respectively.

表 3 脱水对荔枝种子离体胚轴在 WPM 培养基中生长的影响(培养 12 天)

Table 3 Effect of desiccation on the growth of lychee embryonic axes culture in WPM medium for 12 days

Drying method	Time (h)	Moisture content (%)	Plumule		Radicle	
			Emergence (%)	Length (cm)	Emergence (%)	Length (cm)
With silica gel under air pressure	0	53.1	90.0	1.68 ± 0.30	100	4.57 ± 0.36
	2.5	45.4	37.5	0.75 ± 0.20	100	3.66 ± 0.43
	3.5	40.2	37.5	0.70 ± 0.16	100	3.18 ± 0.36
	4.5	38.9	40.0	0.50 ± 0.05	100	3.85 ± 0.67
	5.5	37.5	30.5	0.45 ± 0.15	100	3.36 ± 0.47
	6.5	30.1	42.4	0.57 ± 0.18	100	3.30 ± 0.26
	7.5	21.1	25.0	0.20 ± 0.06	100	0.54 ± 0.09
	9.5	18.9	12.5	0.10 ± 0.00	100	0.35 ± 0.05
With silica gel under reduced pressure	0	53.1	90.0	1.68 ± 0.30	100	4.57 ± 0.36
	1	40.0	62.5	1.20 ± 0.24	100	4.50 ± 0.25
	2	30.7	42.8	0.63 ± 0.15	100	2.79 ± 0.47
	3	23.6	0	0	100	1.40 ± 0.23
	4	16.9	0	0	100	0.57 ± 0.19

四、脱水对荔枝和龙眼种子离体胚轴的零上低温贮存的影响

含水量为 56.7% (未脱水) 和 32.6% (硅胶脱水) 的荔枝种子离体胚轴贮于 5℃ 下 14

天后于 WPM 培养基上培养 12 天,生长均正常(表 5)。培养 25 天成苗,但生长势出现了明显下降,其中以脱水的(含水量为 32.6%)胚轴下降较快。贮存 30 天者由于胚轴的活力下降,菌类的侵染,培养 6 天时已全部感染。含水量为 49.1%(未脱水)和 23.8%(硅胶脱水)的龙眼种子离体胚轴贮于 5℃和 10℃下 4 天后接种,培养 12 天生长正常,但生长势也明显下降(表 6),培养 25 天均可成苗。贮存 14 天时接种培养 6 天,已全部感染。活力的下降以脱水的胚轴较快,由此看来,脱水后贮藏,损伤较大,其中以 5℃下贮藏的损伤较重。

表 4 脱水对龙眼种子离体胚轴在 WPM 培养基中生长的影响(培养 12 天)

Table 4 Effect of desiccation on the growth of longan embryonic axes culture in WPM medium for 12 days

Drying method	Time(h)	Moisture content(%)	Plumule		Radicle	
			Emergence(%)	Length(cm)	Emergence(%)	Length(cm)
With silica gel under air pressure	0	49.1	100	2.87±0.29	100	5.93±0.07
	1	33.1	100	2.07±0.40	100	5.80±0.41
	2	26.2	100	1.20±0.26	100	5.75±0.38
	3	23.5	83.3	0.86±0.28	100	5.42±0.48
	4	19.9	60.0	0.80±0.36	100	1.00±0.31
	5	17.6	50.0	0.34±0.04	100	0.68±0.05
With silica gel under reduced pressure	0	49.1	100	2.87±0.29	100	5.93±0.07
	1	23.1	100	1.00±0.23	100	5.45±0.38
	2	12.8	16.7	0.35±0.05	100	3.43±0.60
	3	7.0	0	0	100	0.83±0.22

表 5 荔枝种子胚轴低温贮藏效果(培养 12 天)

Table 5 Effect of storage at 5℃ on the growth of embryonic axes of lychee seeds (incubation for 12 days)

Storage(day)	Moisture content(%)	Plumule		Radicle	
		Emergence(%)	Length(cm)	Emergence(%)	Length(cm)
0	56.7	100	1.82±0.29	100	4.96±0.35
	32.6	64.5	1.05±0.23	100	3.88±0.20
4	56.7	83.3	1.24±0.59	100	4.18±0.37
	32.6	50.0	0.94±0.14	100	4.20±0.30
14	56.7	75.0	0.65±0.21	100	3.97±0.41
	32.6	42.6	0.40±0.10	100	2.15±0.19

表 6 龙眼种子胚轴低温贮藏效果(培养 6 天)

Table 6 Effect of storage at low temperatures on the growth of embryonic axes of longan seeds (incubation for 6 days)

Storage(day)	Moisture content(%)	5℃		10℃	
		Emergence(%)	Length(cm)	Emergence(%)	Length(cm)
0	49.1	100	1.98±0.13	100	1.98±0.13
	23.8	100	1.52±0.22	100	1.52±0.22
4	49.1	100	1.28±0.14	100	1.34±0.22
	23.8	100	0.64±0.04	100	0.88±0.09

五、荔枝和龙眼种子离体胚轴的超低温贮存

含水量为 49.1%和 30.4%的龙眼种子离体胚轴用防冻剂(1. 10%DMSO+0.5mol/

1. 甘露醇; 2. 5%DMSO+0.5mol/L 甘露醇; 3. 10%DMSO+5%蔗糖; 4. 5%DMSO+5%蔗糖)于2℃下处理30min后接种,生长正常,和对照无差别。证明短时间的防冻剂浸泡对胚轴的生活力没有影响。

将含水量为29.8—55.6%的荔枝种子离体胚轴用直接和分步液氮冷冻以及防冻剂处理后,液氮贮存,无论是30℃的室温下,还是用30℃的水浴解冻,接种后无一存活(表7)。

含水量为47.6%、40.6%、32.7%和28.5%的龙眼种子离体胚轴直接和分步进行液氮冷冻后,采用30℃室温和30℃的水浴解冻,接种,无一存活。含水量为17.5%的龙眼胚轴用直接法和分步法进行液氮贮存24h,于室温30℃下解冻后,培养30天存活率分别为25%和50%,在所加的防冻剂中并未表现出明显的防冻效果(表7),几种防冻剂组合处理的胚轴,经液氮贮存后的存活率相差不大(表中的存活率为其平均值)。存活的胚轴生长极为缓慢,在实验期间尚未成苗。

表7 荔枝和龙眼种子离体胚轴经液氮贮藏24小时后的存活率(%) (培养30天)

Table 7 The survival percentages of excised embryonic axes of lychee and longan seeds stored in liquid nitrogen for 24h

Species	Moisture content (%)	No cryoprotectants		Cryoprotectants added	
		Frozen directly	Frozen by steps	Frozen directly	Frozen by steps
Lychee	55.6	0	0	0	0
	49.3	0	0	0	0
	40.1	0	0	0	0
	32.3	0	0	0	0
	29.8	0	0	0	0
Longan	47.6	0	0	0	0
	40.6	0	0	0	0
	32.7	0	0	0	0
	28.5	0	0	0	0
	17.5	25.0	49.7	26.2	35.8

讨 论

荔枝种子胚轴于1/2 MS等十几种培养基中均未能成苗。* 在本实验中得知荔枝及龙眼种子离体胚轴极易于WPM培养基上生长,适应的pH值范围较广,且不需加激素就可正常成苗。

荔枝和龙眼种子含水量分别降至30%和23%时就已基本上丧失了发芽力^[3],其胚轴脱水至此含水量时,于WPM中培养25天仍可成苗,表现出较强的耐脱水力。但从快速脱水的离体胚轴贮藏试验证明,零上低温导致活力迅速下降及菌类的侵染,难以作胚轴的长

* 乔原珍,中山大学生物系89年硕士论文。

期贮存。

顽拗性种子的种质保存可以通过超低温保存其离体胚的途径来实现^[6]。种子及种胚的抗冻力与其含水量及防冻剂的使用密切相关^[5,6,11]。橡胶种子胚脱水至临界含水量(14—20%)^[8]后,经液氮贮存有20—69%的存活率^[12]。荔枝种子离体胚轴的临界含水量较高(30%),在本试验条件下没有达到预期的结果,接近临界含水量的荔枝胚轴,经液氮贮藏后无一存活,所采用的几种防冻剂组合也未表现防冻效果。龙眼种子离体胚轴的临界含水量较低(23%),表现出较强的耐脱水及对脱水伤害的修复力。高于临界含水量的龙眼种子离体胚轴,经液氮贮存后无一存活,但接近临界含水量的龙眼胚轴,经液氮贮存后约有25—50%的存活率。在本菠萝种胚的超低温贮存时,加入防冻剂是可取的^[7]。而我们所采用的几种防冻剂组合,对龙眼种子并没有表现出明显的防冻效应。存活的龙眼胚轴生长极缓慢,未能成苗,但这一结果为荔枝和龙眼种质保存提供了可能性。下一步待解决的问题是提高液氮贮存后的再生及使存活的胚轴迅速成苗,这可以从脱水、冷冻和解冻速度、防冻剂的选择、培养基及种胚成熟度等方面探讨。

参 考 文 献

- [1] 马继生,作物种质资源保存研究论文集。学术书刊出版社,1989,79—129。
- [2] 罗士韦,唐惕,植物组织和细胞的超低温保存及种质库建立的研究。细胞生物学杂志,1983,5,1—7。
- [3] 张北壮,傅家瑞,几种热带亚热带果树顽拗型种子的贮藏研究。中山大学学报(自然科学版),1989,29,92—95。
- [4] 夏清华,陈润政,傅家瑞,荔枝种子成熟前10天的生理变化。植物生理学通讯,1990,(3):37—38。
- [5] 傅家瑞,顽拗种子的贮藏及种质资源保存问题。种子,1988,(3):51—53。
- [6] Bajaj, Y. P. S., Cryopreservation of embryos. In "Cryopreservation of Plant Cells and Organs (Kartha, K. K. eds)". CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1985, 227—242。
- [7] Chin, H. F., Excised embryos—A new alternative to seed storage. ISTA 22nd Congress 1989, Edinburgh, Scotland.
- [8] Chin H. F., M. Aziz, B. B. Ang and S. Hamzah, The effect of moisture and temperature on the ultrastructure and viability of *Hevea brasiliensis*. *Seed Sci. & Technol.*, 1981, 9, 411—422。
- [9] Chin, H. F., Y. L. Hor, and M. B. Mold Lassim, Identification of recalcitrant seeds. *Seed Sci. & Technol.*, 1984, 12, 429—436。
- [10] Hanson, J., The storage of seeds of recalcitrant tree fruits. In "Crop genetic resource: Conservation and Evaluation (Holden, J. H. W and J. T. Williams eds)". Geogre Allen and Unwin, London, 1984, 53—62。
- [11] Hor, Y. L., H. F. Chin and P. C., Effects of dehydration on freezing characteristics and survival in liquid nitrogen of three recalcitrant seeds. ISTA 22nd Congress. 1989, Edinburgh, Scotland.
- [12] Normah, M. N., H. F. Chin and Y. L. Hor, Desiccation and cryopreservation of embryonic axes of *Hevea brasiliensis*. *Muell-Arg. Pertanika*, 1986, 9, 299—303。
- [13] Ray, P. K., and S. B. Sharma, Viability of *Litchi chinensis* Seeds when stored in air and in water. *J. Agric. Sci. Camb.*, 1985, 104, 247—248。
- [14] Roberts, E. H., Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci. & Technol.*, 1973, 1, 499—514。
- [15] Roberts, E. H. M. W. King and R. H. Eills, Recalcitrant seeds: Their recognition In "Crop genetic resource: Conservation and Evaluation (Holden, J. H. W. and J. T. Williams eds)". Geogre Allen and Unwin, London, 1984, 38—52。
- [16] Stanwood, P. L., Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation In "Cryopreservation of Plant Cells and Organs (Kartha, K. K. eds)". CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1985, 199—226。

THE DESICCATION AND STORAGE OF EMBRYONIC AXES
OF LYCHEE (*LITCHI CHINENSIS* SONN.) AND LONGAN
(*DIMOCARPUS LONGAN* LOUR.) SEEDS

Xia Qinghua, Chen Runzheng and Fu Jiarui
(Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract

Embryonic axes excised from fresh lychee and longan seeds could be cultured and developed into plantlets in non-hormonal WPW medium with pH 4.8—8.0. The addition of NAA and KT to the medium caused the inhibition on the normal growth of embryonic axes. The critical moisture contents of the embryonic axes of lychee and longan were about 30% and 23% respectively. Desiccation beyond these thresholds, the viability fell rapidly, and the embryonic axes could not produce normal plantlets after incubation for 25 days. The viability of embryonic axes desiccated by silica gel decreased more quickly than that of non desiccated ones after short-time storage, and the embryonic axes were easily infected by bacteria during incubating. The survival percentages of lychee and longan embryonic axes desiccated to about the critical moisture contents were 0 and 25—50%, respectively, when they had been stored in liquid nitrogen for 24 hours.

Key words: Embryonic axes; Lychee; Longan; Moisture content; Desiccation; Storage