

植物顽拗性种子研究进展

李磊^{a,b}, 孟珍贵^{a,b}, 龙光强^a, 张广辉^a, 杨生超^a, 陈军文^{a,b*}

(云南农业大学, a. 云南省优势中药材规范化种植工程研究中心; b. 农学与生物技术学院, 昆明 650201)

摘要: 对植物顽拗性种子的概念、物种分类、形态、分布及一些生理生态特征进行了综述, 分析了顽拗性种子脱水敏感性的原因和对环境的生态适应性, 探讨其可能的进化地位和贮存技术。同时, 对顽拗性种子研究的发展趋势和应用前景进行了展望, 即加强生境调查, 更新顽拗性种子植物数据库, 从形态学、生理生态学和分子生物学分析种子顽拗性本质。

关键词: 顽拗性种子; 脱水敏感性; 萌发; 生态进化; 超低温保存

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.01.015

Advances on Recalcitrant Seeds of Plants

LI Lei^{a,b}, MENG Zhen-gui^{a,b}, LONG Guang-qiang^a, ZHANG Guang-hui^a, YANG Sheng-chao^a, CHEN Jun-wen^{a,b*}

(a. Yunnan Provincial Research Center on Good Agricultural Practice for Dominant Chinese Medicinal Materials; b. College of Agriculture and Biotechnology, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201, China)

Abstract: The concepts, classification, morphology, distribution and physiological ecology characters in recalcitrant seeds were reviewed, the reasons of desiccation sensitivity and the adaptability to ecological environment of recalcitrant seeds were analyzed, its possible evolution status and effective storage technology were discussed. The development tendency and application prospects for studying on recalcitrant seeds were proposed. It was suggested that the further researches should be focus on these issues, such as habitat investigation, establishment and update of plant database in recalcitrant seeds, and analysis of the nature of recalcitrant seed based on morphological, physiological ecology and molecular biology.

Key words: Recalcitrant seed; Desiccation-sensitivity; Germination; Ecological evolution; Cryopreservation

种子是裸子植物和被子植物特有的繁殖器官, 经过亿万年进化形成利于传播和抵御逆境的结构, 是植物种族延续的重要载体。近年来, 对顽拗性种子的生理脱水机制以及生态进化特性等进行了研究, 探讨其形成机制, 为解决顽拗性种子的贮藏与繁殖等问题提供依据。但目前关于顽拗性种子分子生物学的研究报道相对较少。本文综述了顽拗性种子的概念、植物学分类、生境分布、形态、脱水耐性、生态系统进化以及保存技术等方面的研究进展, 阐明种子顽拗性是个多方面的复合性状, 并展

望了今后的研究方向, 为加深对顽拗性种子的认识, 探究新的顽拗性种子类群和分析顽拗性种子脱水机制和贮藏技术, 以及为顽拗性种子的研究奠定基础。

1 顽拗性种子概念的形成

1973年, Roberts 根据种子的贮藏行为, 把种子分为正常性种子和顽拗性种子两种类型^[1]。正常性种子在成熟时已经完成脱水过程, 因此能够以较低

收稿日期: 2015-03-23

接受日期: 2015-07-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(81360609); 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养项目(2014HB011)资助

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 81360609), and the Project of Young and Middle-aged Talent of Yunnan Province (Grant No. 2014HB011).

作者简介: 李磊(1989~), 女, 硕士研究生, 主要从事种子生理生化研究。E-mail: ziyou_0722@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: cjw31412@163.com

的含水量进行正常的生长发育。而顽拗性种子在成熟过程中并不发生脱水行为,种子在成熟脱落时仍然保持着较高的含水量,在整个生长发育过程对脱水和低温敏感^[2-3]。这一概念的提出,为上世纪种子科学研究做出了巨大的贡献。陶嘉龄于1984年首次将这一概念译为“顽拗型种子”^[4],后来还曾译为“异端型种子”^[5]。1991年,傅家瑞首次将“顽拗型种子”改为“顽拗性种子”,此后“顽拗性种子”被广泛使用^[6]。

不同植物顽拗性种子的顽拗性程度不同,1988年Farrant等根据种子对脱水敏感性的差异,提出种子顽拗性连续群的概念,将顽拗性种子分为高度、中度和低度顽拗性3种类型^[7],认为源自热带湿地的海榄雌(*Avicennia marina*)种子属于“高度顽拗性种子”;源自温带的七叶树(*Aesculus hippocastanum*)种子属于“低度顽拗性种子”;而菜豆(*Phaseolus vulgaris*)种子属于正常性种子^[8]。高度顽拗性种子对脱水和低温高度敏感;低度顽拗性种子可以忍受一定程度的脱水,在低温下能贮藏若干年。同时,Bonner结合生境和贮藏条件将植物种子分为“真正正常型种子”、“亚正常型种子”、“温带顽拗型种子”以及“热带顽拗型种子”;“真正正常型种子”能够在冰点以下贮藏相当长的时间,并且含水量为5%~10%时仍可正常生长,大多数的温带经济林树种的种子属于此类;“亚正常型种子”虽可忍耐同样的低温和含水量,但只能保存较短的时间,大部分高脂质种子属于此类;“温带顽拗型种子”不耐脱水但可以贮藏于接近冰点以下环境中;“热带顽拗型种子”对脱水和低温高度敏感^[9]。此外,Ellis等的研究表明,在“正常型种子”和“顽拗型种子”之间有一种过渡贮藏类型的种子存在,即“中间型种子”;“中间型种子”可以像正常种子一样脱水到较低的含水量(12%~15%),但对低温敏感,通常适用正常型种子的贮藏环境^[10-11]。从种子顽拗性复合数量性状特征来看,“顽拗型种子”和“正常型种子”并不是互相割裂对立的事物,而是分别位于1个连续谱的2个端点,确定种子顽拗性连续谱的存在^[12-14]。

2 植物学分类

顽拗性种子(果实)主要存在于两类植物中:一类为水生草本植物,如水浮莲(*Eichhornia crassipes*)、菱(*Trapa bispinosa*)和茭白(*Zizania latifolia*)等;第二类是具有大粒种子(果实)的多年生木本植物,如可

可(*Theobroma cacao*)、巴西橡胶(*Hevea brasiliensis*)、椰子(*Cocos nucifera*)、肉豆蔻(*Myristica fragrans*)和大叶桂(*Cinnamomum iners*)等热带作物,鳄梨(*Persea americana*)、芒果(*Mangifera indica*)、榴莲(*Durio zibethinus*)、山竹子(*Hedysarum fruticosum*)、红毛丹(*Nephelium lappaceum*)、荔枝(*Litchi chinensis*)、龙眼(*Dimocarpus longan*)、番樱桃(*Eugenia uniflora*)、菠萝蜜(*Artocarpus heterophyllus*)和黄皮(*Clausena lansium*)等热带果树,坡垒(*Hopea Hainanensis*)、青皮(*Vatica mangachapoi*)和棕榈(*Trachycarpus fortunei*)等热带树木,以及板栗(*Castanea mollissima*)、栎树(*Quercus acutissima*)、枳(*Poncirus trifoliata*)和欧亚槭(*Acer pseudoplatanus*)等温带植物^[6,15]。这些植物的顽拗性种子(果实)采收或脱落时含水量较高,千粒重大,大多数在1 kg以上,最高的榴莲种子达到14783 g^[16]。此外,除少数植物(水浮莲、茭白、椰子、棕榈等)外,绝大部分属于双子叶植物,且多为落叶植物。

具有顽拗性种子与其他类型种子的植物在系统分类上并没有明显的界线,产生顽拗性种子(果实)的植物也并不局限于少数种类,大部分植物科属中都会有一些顽拗性种子(果实)的物种,其贮藏特性与所在科属间好像并不存在必然的联系,同科植物中通常有各种贮藏类型的种子(果实),即使同属不同种的植物中也可有不同贮藏类型的种子(果实)^[14]。曾对不同时期和地区的顽拗性种子植物进行了统计,由于评定顽拗性种子的标准有差异,造成统计结果的不同。Hofmann等记载具顽拗性种子的植物有186种,隶属于64科124属;Pritchard等报道顽拗性种子的植物有514种,隶属于65科192属^[17]。Farnsworth根据文献资料,认为195种植物种子为顽拗型,隶属于63科195属^[18]。文彬等根据丘园公布的信息统计,在已确定贮藏习性的9953种植物中,顽拗性种子的有527种,隶属于69科201属,占总数的5.29%,中间型种子的有145种,隶属于39科8属,占总数的1.46%,其余9281种皆属正常性种子^[12]。分析表明,源自于热带及亚热带地区的龙脑香科(Dipterocarpaceae)和棕榈科(Arecaceae)等植物多具有顽拗性种子(果实),均为所属地区的代表性科植物(表1)。随着种子研究的不断深入,可能更多的顽拗性种子植物将被发现,也可能某些曾被认为具顽拗性种子的植物重新划分为其他贮藏类型。

表 1 部分顽拗性种子植物名录

Table 1 List of part plants with recalcitrant seeds

科 Family	种 Species	生活型 Life Form	生境 Habitat	参考文献 Reference
槭树科 Aceraceae	<i>Acer</i> spp.	T	W	[17]
泽泻科 Alismataceae	<i>Sagittaria latifolia</i>	H	B	[17]
石蒜科 Amaryllidaceae	<i>Lycoris chinensis</i>	H	W	[88]
漆树科 Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i>	T	R	[6]
番荔枝科 Annonaceae	<i>Cymbopetalum baillonii</i>	ST	R	[17]
夹竹桃科 Apocynaceae	<i>Hancornia speciosa</i>	T	R	[17]
	<i>Landolphia kirkii</i>	V	R	[17]
天南星科 Araceae	<i>Xanthosoma sagittifolium</i>	S	B	[17]
五茄科 Araliaceae	<i>Hedera helix</i>	V	W, PL	[17]
南洋杉科 Araucariaceae	<i>Agathis robusta</i>	T	R	[17]
	<i>Araucaria</i> spp.	T	C	[17]
棕榈科 Arecaceae	<i>Areca catheca</i>	P	R	[17]
	<i>Calamus</i> spp.	P	B	[17]
	<i>Cocos nucifera</i>	P	C	[6]
	<i>Chrysalidocarpus leuieicens</i>	P	R	[17]
	<i>Sabal</i> spp.	P	R	[17]
菊科 Asteraceae	<i>Acamptopappus</i> spp.	S	D	[17]
木棉科 Bombacaceae	<i>Durio zibethinus</i>	T	R	[6]
紫草科 Boraginaceae	<i>Cordia alliodora</i>	T	R	[17]
橄榄科 Burseraceae	<i>Dacryodes excelsa</i>	T	R	[17]
番木瓜科 Caricaceae	<i>Jacaratia dolichaula</i>	ST	R	[17]
金鱼藻科 Ceratophyllaceae	<i>Ceratophyllum</i> sp.	H	A	[17]
藜科 Chenopodiaceae	<i>Chenopodium quinoa</i>	H	PL	[17]
金壳果科 Chrysobalanaceae	<i>Coupeia polyandra</i>	ST	R	[17]
藤黄科 Clusiaceae	<i>Garcinia mangostana</i>	ST	R	[17]
	<i>Symphonia globulifera</i>	ST	R	[17]
使君子科 Combretaceae	<i>Conocarpus erectus</i>	ST	C	[17]
	<i>Laguncularia racemosa</i>	T	C	[17]
榛木科 Corylaceae	<i>Corylus americana</i>	ST	R	[17]
葫芦科 Cucurbitaceae	<i>Telfaira occidentalis</i>	S	PL	[17]
柏科 Cupressaceae	<i>Cupressrs macrocarpa</i>	ST	R	[17]
龙脑香科 Dipterocarpaceae	<i>Anisoptera laevis</i>	T	R	[17]
	<i>Dipterocarprs</i> spp.	T	R	[17]
	<i>Dryobalanops aromatica</i>	T	R	[17]
	<i>Hopea</i> spp.	T	R	[6]
	<i>Parashorea densiflora</i>	T	R	[17]
	<i>Parashorea chinensis</i>	T	R	[57]
	<i>Shorea robusta</i>	T	R	[17]
	<i>Stemonoporus oblongifolius</i>	T	R	[17]
柿科 Ebenaceae	<i>Diospyros virginiana</i>	ST	W	[17]
杜英科 Elaeocarpaceae	<i>Sloanea berteriana</i>	T	R	[17]
大戟科 Euphorbiaceae	<i>Dalechampia scandens</i>	V	W	[17]
	<i>Hevea brasiliensis</i>	T	R	[56]
豆科 Fabaceae	<i>Castanospermum australe</i>	ST	C	[17]
	<i>Hedysarum fruticosum</i>	S	PL	[6]
壳斗科 Fagaceae	<i>Lithocarpus densiflorus</i>	T	W	[17]
	<i>Castanea dentata</i>	T	W	[75]
	<i>Quercus</i> spp.	T	W	[6]
大风子科 Flacourtiaceae	<i>Casearia corymbosa</i>	T	R	[17]
	<i>Dovyalis hebecarpa</i>	ST	PL	[17]
	<i>Flcourtia indica</i>	ST	R	[17]
	<i>Muntingia calabura</i>	ST	R	[17]
七叶树科 Hippocastanaceae	<i>Aesculus hippocastanum</i>	ST	W	[7]
唇形科 Labiatae	<i>Baccaurea ramiflora</i>	T	H	[90]
	<i>Cinnamomum iners</i>	T	H	[17]
	<i>Nectandra ambigens</i>	ST	R	[17]

续表 (Continued)

科 Family	种 Species	生活型 Life Form	生境 Habitat	参考文献 Reference
唇形科 Labiatae	<i>Machilus thunbergii</i>	ST	B	[17]
	<i>Persea americana</i>	S	R	[6]
玉蕊科 Lecythydaceae	<i>Bertholletia excelsa</i>	T	R	[17]
	<i>Lecythis ampla</i>	T	R	[17]
山梗菜科 Lobeliaceae	<i>Lobelia</i> sp.	S	H	[17]
马钱科 Loganiaceae	<i>Fagraea fragrans</i>	S	R	[17]
野牡丹科 Melastomataceae	<i>Michelia champaca</i>	T	R	[17]
	<i>Melastoma malabathricum</i>	S	B	[17]
楝科 Meliaceae	<i>Aglaia odorata</i>	S	R	[17]
	<i>Turrianthus africana</i>	T	R	[17]
	<i>Carapa guianensis</i>	T	B	[17]
	<i>Guarea glabra</i>	T	R	[17]
桃金娘科 Myrtaceae	<i>Amomyrtus lama</i>	T	R	[17]
	<i>Eugenia</i> spp.	ST	R	[17]
桑科 Moraceae	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	T	R	[6]
肉豆蔻科 Myristacaceae	<i>Myristica fragrans</i>	ST	R	[15]
猪笼草科 Nepenthaceae	<i>Nepenthes gracilis</i>	E	B	[17]
睡莲科 Nymphaeaceae	<i>Nymphaea</i> sp.	H	A	[17]
紫树科 Nyssaceae	<i>Nyssa aquatica</i>	T	B	[17]
酢浆草科 Oxalidaceae	<i>Averrhoa carambola</i>	ST	R	[17]
	<i>Oxalis</i> sp.	S	W	[17]
木犀科 Oleaceae	<i>Ligustrum obtusifolium</i>	S	H	[58]
胡椒科 Piperaceae	<i>Piper hispidum</i>	S	R	[17]
禾本科 Poaceae	<i>Spartina anglica</i>	H	C	[17]
	<i>Zizania aquatica</i>	H	B	[6]
罗汉松科 Podocarpaceae	<i>Podocarpus henkelii</i>	S	W	[17]
眼子菜科 Potamogetonaceae	<i>Potamogeton</i> sp.	H	B	[17]
雨久花科 Pontederiaceae	<i>Eichhornia crassipes</i>	H	A	[6]
山龙眼科 Proteaceae	<i>Macadamia ternifolia</i>	ST	PL	[17]
毛茛科 Ranunculaceae	<i>Caltha palustris</i>	H	B	[17]
红树科 Rhizophoraceae	<i>Carallia brachiata</i>	ST	B	[17]
蔷薇科 Rosaceae	<i>Eriobotrya japonica</i>	ST	W	[17]
茜草科 Rubiaceae	<i>Ixora</i> sp.	ST	R	[17]
	<i>Coffea</i> spp.	ST	H	[17]
	<i>Posoqueria latifolia</i>	ST	B	[17]
	<i>Clausena dentata</i>	ST	PL	[17]
芸香科 Rutaceae	<i>Citrus</i> spp.	ST	PL	[17]
	<i>Fortunella japonica</i>	ST	PL	[17]
	<i>Clausena lansium</i>	ST	PL	[55]
	<i>Vatica mangachapoi</i>	S	W	[6]
檀香科 Santalaceae	<i>Santalum album</i>	ST	R	[17]
无患子科 Sapindaceae	<i>Litchi chinensis</i>	ST	R	[17]
无患子科 Sapindaceae	<i>Euphoria longan</i>	ST	R	[17]
	<i>Meliococcus bijugatus</i>	ST	R	[17]
	<i>Magonia pubescens</i>	ST	R	[17]
	<i>Nephelium lappaceum</i>	T	R	[6]
	<i>Calocarpum sapota</i>	T	R	[17]
山榄科 Sapotaceae	<i>Chrysophyllum cainito</i>	ST	R	[17]
	<i>Manilkara zapota</i>	T	R	[17]
	<i>Mimusops</i> spp.	T	PL	[17]
	<i>Pouteria ramiflora</i>	T	R	[17]
	<i>Quassia indica</i>	T	R	[17]
毛地黄科 Scrophulariaceae	<i>Cola nitida</i>	ST	W	[17]
苦木科 Simaroubaceae	<i>Theobroma cacao</i>	ST	R	[6]

续表 (Continued)

科 Family	种 Species	生活型 Life Form	生境 Habitat	参考文献 Reference
海人树科 Surianaceae	<i>Guilfoylia monostylis</i>	T	R	[17]
山茶科 Theaceae	<i>Camellia sinensis</i>	ST	H	[17]
菱科 Trapaceae	<i>Trapa bispinosa</i>	H	A	[6]
马鞭草科 Verbenaceae	<i>Vitex divaricata</i>	T	R	[17]
	<i>Avicennia marina</i>	T	C	[7]
蜡烛树科 Vochysiaceae	<i>Vochysia honurensis</i>	T	R	[17]

T: ≥10 m 乔木; ST: 小乔木; S: 灌木; V: 藤本植物; P: 棕榈类植物; H: 草本植物; W: 湿地; B: 沼泽; R: 雨林; PL: 耕地; C: 海岸; D: 沙漠; A: 水生; H: 山地。

T: ≥10 m Tree; ST: Small tree; S: Shrub; V: Vine/liana; P: Palm; H: Herb; W: Wetland; B: Bog; R: Rainforest; PL: Plough; C: Coast; D: Desert; A: Aquatic; H: Hill.

3 地区分布

大部分顽拗性种子植物生活在热带雨林、河边或者海岸, 无论是土壤含水量还是空气湿度都很高, 湿润的环境有利于种子萌发和幼苗的生长。Farnsworth报道顽拗性种子中大约79%来自热带雨林, 15%来自季节性明显的温带河岸地区, 而且顽拗性种子大多是在热带季风期或是雨季来临时成熟, 避免经历少雨干旱条件^[18]。Tweddle等对886种乔灌木植物进行调查, 从热带到温带, 从湿热地区到干热地区, 顽拗性种子植物种类呈逐渐减少的趋势^[19]。

顽拗性种子植物也通常生长在季节性明显的环境中, 能够最大化地帮助顽拗性种子植物的生长, 有利于植物幼苗库的成功建立^[3]。一些温带林地的顽拗性种子在春季或夏末成熟脱落, 秋季萌发并长成幼苗以避免冬季的寒冷低温; 其他一些种子则是在秋季脱落, 以种子的形式过冬, 其先决条件是这些顽拗性种子具有一定的耐低温能力, 如寒冷的冬季能够帮助七叶树种子打破休眠而使其萌发率提高^[20-21]。在高度季节性或是干旱热带地区, 植物种子的脱水敏感性反映了其专业化的再生策略, 也就是对水分的有效利用。如非洲草原上一些顽拗性种子植物, 种子在雨季到来之前开始脱落^[22], 脱落后迅速萌发, 可确保种子充分利用环境中的水分。季节性明显的温带生境湿度较低, 温带顽拗性种子则进化出具一定程度的耐脱水能力, 通常来说, 温带地区的顽拗性种子的耐脱水能力要高于热带地区的^[20]。

4 形态特征

大部分产自于热带、亚热带植物的顽拗性种子的千粒重通常在500 g以上, 大粒种子采收或脱落时含水量较高, 大都在30%以上^[16]。Hong等对1080种

植物种子的平均千粒重进行研究, 认为顽拗性种子的平均重量大于中间性种子, 而中间性种子又大于正常性种子, 三者之间逐渐过渡^[23]。Dickie等报道205种顽拗性种子的平均重量为3958 mg, 而839种正常性种子的平均重量只有329 mg^[24]。种子的大粒性可能是一种生态进化优势。大粒种子通常生长发育成大型幼苗, 使其在低光和干燥环境条件下存活的可能性提高, 而且比小粒种子更容易躲避食草性动物的啃食^[25-28], 这一适应性策略可能更有利于捕食者对种子进行散布, 植物种群因而得以扩散和延续。另一方面, 大量的研究表明热带雨林地区龙脑香科植物的大粒顽拗性种子容易受到脊椎动物的捕食, 因此, 为躲避捕食者的侵食, 这些植物的大粒顽拗性种子通常进化为具有快速萌发的特性, 因为种子相对于幼苗来说对捕食者更具有吸引力^[29-30]。

Tompsett对南洋杉科(Araucariaceae)植物的研究表明, 种子的脱水耐性与种子(或胚轴)的大小相关^[31]。龙脑香科植物种子的脱水耐性也与种子的大小及形状相关^[32], 脱水敏感性种子的表面积与体积之比要小于正常性种子。对非洲干旱地区8科具经济价值树种种子的研究表明, 顽拗性种子的种皮(或果皮)重量占整个种子重量的比例要小于正常性种子, 也就是说顽拗性种子的种皮相对要薄。顽拗性种子桃金娘科(Myrtaceae)肯氏蒲桃(*Syzygium cumini*)、楝科(Meliaceae)吐楝(*Trichilia emetica*)和山榄科(Sapotaceae)乳油木(*Vitellaria paradoxa*)的种皮重量分别仅占整个种子重量的7.6%、13.9%和23.5%, 而正常性种子槭树科(Aceraceae)荷荷巴(*Sclerocarya birrea*)和紫葳科(Bignoniaceae)丰雨果(*Kigelia africana*)的分别却高达88%和71%^[32]。薄种皮(果皮)可能是顽拗性种子植物的一种有效经济投资, 种皮(果皮)比重小可以保证种子其他结构的充分生长, 而且薄种皮(果皮)有助于胚根快速萌发成苗^[15], 这样可

以避免捕食者取食种子。

然而，并不是所有植物种子的形态大小与种子的贮藏行为都有直接联系。有研究表明，槭树科种子贮藏行为的不同并没有反映在种子重量(大小)上，而是在形态结构上表现明显差异，即扁平状种子对脱水均不敏感，而一些表面凸起状种子不耐脱水属于顽拗性种子，后者的种子形态特征可以有效减少种子内部水分的丧失^[33]。周浙昆等对亚洲及欧洲壳斗科栎属植物果实(种子)的生理生态学及其适应性的研究表明，栎属植物果实(种子)的脱水耐性及脱水行为在属间有着显著的差别，并且首次提出顽拗性种子植物果实(种子)的果皮形态解剖学特征与果实(种子)脱水行为的量性关系^[34]。顽拗性种子一般具有假种皮，很少出现在瘦果、含有多粒种子的浆果、开裂蒴果、荚果(但没有假种皮)、蓇葖果、分果和胞果中，在大多数结长果和结颖果的植物(山榆菜属例外)中也很少出现^[16]，但也有例外，如药用植物三七(*Panax notoginseng*)种子属于典型的顽拗性种子，每粒浆果内至少含有两粒种子。虽然对种子的大小形态与脱水耐性的关系开展了研究，由于调查种类与地区的不同，目前仍未有统一结论，还有待于进一步调查研究。

5 萌发与休眠特性

顽拗性种子脱落于母体时保持较高的含水量和活跃的代谢活动，这可能是其脱落后能够快速进入下一个生长阶段——萌发的原因之一^[32,35]。首先，快速萌发能够最大程度地减少种子暴露于捕食者的持续时间；其次，快速萌发可以使幼苗在最适宜的环境下充分生长^[19]。顽拗性种子，尤其是热带雨林和温带森林植物的顽拗性种子通常在雨季脱落，快速萌发能够有效利用这一环境优势，保证种子水分供给充足。相反，大部分正常性种子由于其特有的休眠属性，成熟脱落时含水量较低，代谢活动相对静止，形成土壤种子库从而延长了被啃食的时间。正常性种子的萌发和休眠均取决于外界环境因子与种子本身特有的结构、植物生长激素和遗传信息等^[16]，其休眠同样也是为了避免种子在不适宜的生长季节萌发，从而躲避严寒、干燥等恶劣环境条件。此外，种子的萌发还与其内部活性氧自由基(ROS)的含量和ROS清除系统的活性密切相关^[36]。然而，在一些温带和热带地区都生长着具有休眠特性的顽拗性种子植物^[37]。也就是说，并不是所有的

顽拗性种子都能够快速萌发。对886种乔灌木的调查表明，有61.1%的植物种子具有休眠特性，而顽拗性种子占9.1%^[19]。具休眠特性的顽拗性种子脱离母体时，往往胚并未分化完全、或是虽已完成形态成熟但并未完成生理成熟，只有经过一段时间的后熟过程，这类种子的胚在形态上才能发育完全或是达到真正的生理成熟。种子休眠的原因有两类：其一是自身的原因，如胚发育不全或种皮效应；其二是环境条件的限制，如高温或光等环境因子的胁迫^[16]。种子休眠一般分为5种类型：生理休眠、形态休眠、形态生理休眠、物理休眠和复合休眠^[38]。后熟特性是种子休眠的一种状态或是引起种子休眠的原因之一，是许多胚休眠类型的种子向萌发过渡的必经过程。多数具有后熟特性的顽拗性种子具有厚实而坚硬的种皮或果皮^[19]，我国西双版纳地区热带雨林的小叶藤黄(*Garcinia cowa*)种子的种皮构成了坚实的壁垒，水分无法透过种皮渗入其内部，且胚根无法穿过种皮伸长，造成种子休眠；其种子在雨季后期成熟脱落进入休眠期，直到翌年雨季才开始萌发，可以避免幼苗受到冬季干燥低温的环境胁迫^[37]。一些药用植物顽拗性种子多具有后熟特性，生长于亚热带地区的三七种子在脱落时，胚尚未发育完全，需要经过60~100 d的生理后熟期才能成熟，形成子叶、胚轴和胚根，开始萌发^[39]。我们前期对三七种子后熟特性的研究也得到类似结果(图1)，1月为亚热带地区气温最低的月份，三七种子为躲避寒冷气候而选择进化出后熟特性，进行形态生理休眠。三七种子从采收到幼苗大约需70 d，其中种胚的形态成熟期约在果实成熟后的30~35 d，10~15 d为胚的生理后熟期，10~15 d为胚萌发期，幼苗形成期为10 d左右。

6 脱水耐受性生理学研究

顽拗性种子在整个生长过程以及脱落母体后始终保持对脱水的敏感性。Berjak等的研究表明，海榄雌种子在受精和座果后，经过50~55 d的组织分化后进行生长以及贮藏物质的积累，座果约83 d后种子脱离母体，整个过程不经历成熟脱水，脱落时种子代谢活跃，可溶性碳水化合物大量转移至胚轴中，以利于种子萌发^[40-41]。种子脱水耐性的机制或过程有：① 细胞内去分化；② 代谢关闭；③ 抗氧化系统的存在和有效运转；④ 保护性分子的存在，包括LEA蛋白、蔗糖、寡糖或者半乳糖苷环多

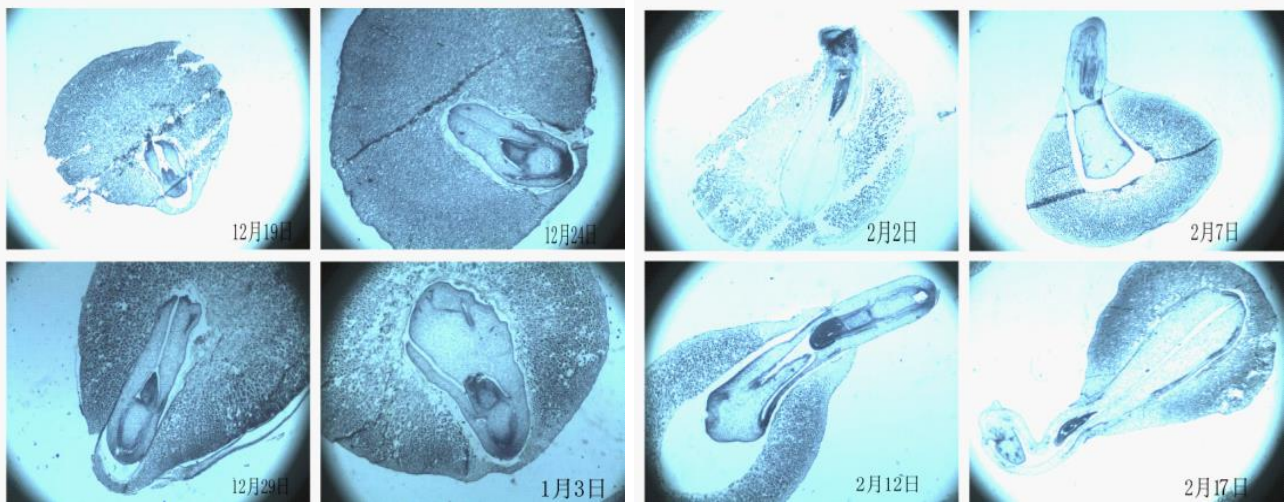


图 1 三七种子后熟期的种胚生长

Fig. 1 Embryo growth of *Panax notoginseng* seed at ripening stage

醇、一些亲水脂分子、脂质体周围的油素层；⑤ 在重新水合过程中修复机制的存在和运转^[42]。Galau 等采用分子标记技术，将经过细胞分化后的胚胎发生分为 5 个连续阶段：① 形态成熟期、② 维管束分离后期、③ 预脱水期、④ 脱水期、⑤ 胚静止期^[43]。对成熟前种子的活力和生活力的研究表明，只有成功地完成胚胎发生的前 3 个阶段并且迅速完成第 4 个阶段的种子才能获得最大的脱水耐性^[35]。顽拗性种子的脱水敏感性是由于不经过胚胎发生阶段①至阶段③^[44]，或是由于种子在完成此阶段之前就已脱落(或萌发)^[45]。

有研究表明，顽拗性种子在脱水过程中，种子内部至少发生 2 种伤害：一种是单纯脱水造成的，即种子内部分子结构受到破坏；另一种是水介导的氧化伤害，也就是当种子含水量处于中等水平时，其内部发生一种不受控制的氧化反应，同样对种子造成脱水伤害^[46-47]。大量研究表明，脱水伤害破坏了顽拗性种子的代谢机制，导致有害的活性氧自由基的积累，如过氧化氢(H_2O_2)、超氧阴离子(O_2^-)、单态氧(1O_2)以及羟基自由基(OH)等^[48-52]。Hendry 等对夏栎(*Quercus robur*)顽拗性种子的研究表明，随着脱水过程的进行，超氧化物歧化酶、谷胱苷肽还原酶、抗坏血酸过氧化物酶等抗氧化酶的活性以及 α -生育酚含量随之下降^[53]。ROS 的产生在所有需氧生物中是不可避免的，尤其在低含水量状态下，氧化胁迫的发生出现在当 ROS 的产生超过了抗氧化酶和非酶抗氧化剂的抑制时，ROS 清除酶的失效以及抗氧化循环系统的裂解，导致氧化伤害和种子活力的丧失^[54]。顽拗性种子中的抗氧化系统不能有效

抵御或延迟活性氧自由基的产生以及脂质过氧化的伤害，从而造成其脱水敏感性。

此外，大量研究表明脱水速率也是影响顽拗性种子脱水耐性的重要因素。对 *Trichilia dregeana* 和澳大利亚栗籽豆(*Castanospermum australe*)以及黄皮等顽拗性种子的研究表明，胚轴的脱水速率越快，其最低安全含水量就越低^[46,55]。海榄雌种子快速脱水后的生活力要比慢速脱水的高一些^[56]。闫兴富等对巴西橡胶(*Hevea brasiliensis*)和水蜡(*Ligustrum obtusifolium*)顽拗性种子的研究表明，在达到相同种子含水量时，快速脱水的种子萌发率要显著高于慢速脱水的^[57-58]。我们对三七种子的研究结论也相似。通常认为在一定脱水程度上，顽拗性种子脱水速率愈快，种子的耐脱水性就愈强^[59]。这可能是由于水分在种子内部保持的时间越长，脱水伤害对种子发生劣变的影响就越大，而快速脱水能够缩短其脱水伤害的时间^[57,60]。

近年来，随着分子生物学技术的发展，从分子水平探讨植物种子耐脱水机理已成为研究热点。LEAs (胚胎发育后期丰富蛋白, Late embryogenic accumulating/abundant proteins)对于正常性种子脱水耐性的获得和保留起到了重要作用^[61]，且 *lea* 基因与许多在干旱胁迫下表达的基因有部分相似^[16,62]。在脱水阶段，由于 LEAs 蛋白的亲水性，在细胞内部结构和大分子周围形成了一层具有保护作用的水态膜，从而使种子具有脱水耐性^[63]。LEA D11 家族(也称脱水素)是由脱水胁迫诱导出的可溶性蛋白，在植物脱水过程中起关键作用，其存在于一些温带、热带、亚热带地区的树种和典型草本植物的顽

拗性种子中, 如 *Porteresia coarctata*、菰属(*Zizania*) 和 大米草(*Spartina anglica*)^[64-65]。虽然 LEAs 在顽拗性种子中的具体功能尚不清楚, 但可以推断顽拗性种子(尤其是热带湿地植物的顽拗性种子)对脱水敏感的部分原因可能是不能积累足够的脱水素, 或是缺乏特有的 LEA 和脱水素^[66]。对栗豆树(*Castanospermum australe*) 顽拗性种子的研究表明, LEA 的缺乏可能是造成其脱水敏感性的根本原因^[67]。在脱水修复机制方面, Côme 等认为在重新水合过程中, 细胞内的部分修复是通过抗氧化系统的有效运作实现的, 而顽拗性种子正是缺乏这种修复机制而体现出脱水敏感性^[68], 但目前关于顽拗性种子脱水修复机制的研究报道极少, 还有待于进一步研究。

7 生境起源及进化特性

起初人们认为, 顽拗性种子植物的原生境多在热带雨林, 因而具有脱水敏感性。但调查表明, 顽拗性种子植物不仅仅局限于热带雨林地区, 在温带以及热带、亚热带干旱地区也有该类种子, 因此对顽拗性种子的研究不能仅仅局限于生境方面。Pritchard 等对非洲干旱地区树种的研究表明, 顽拗性种子植物的比例虽然很低, 但种子大小、快速萌发, 以及雨季前脱落以保持高含水量, 都为种子的萌发和种苗建植提供了有利条件, 是其随气候变化发展进化出的一种再生策略, 而不是重新获得脱水耐性^[32]。顽拗性种子的大粒性是为了降低种子脱水速率, 为其快速萌发保留充足的水分; 快速萌发能够保证种苗的快速生长, 降低种子被啃食的风险, 并迅速获得土壤层的有效水分。

顽拗性种子脱水敏感性在植物界是一种罕见的现象, Flynn 等调查了约 8000 种植物的种子, 结果 90% 以上的种子都具有耐脱水性^[69], 但是顽拗性种子植物在系统分类中分布十分广泛, 且没有明显的系统发生模式^[24]。对 45 个双子叶植物家系的研究表明, 顽拗性种子中胚珠的某些属性依然保持在原始进化水平上, 因此认为顽拗性种子是进化的原始状态^[70]。但 Dickie 等认为种子的脱水耐性才是进化的原始状态^[24]。脱水耐性是一个复杂的特性, 受多个基因控制, 仅缺少 1 个基因就可能丧失这种耐性, 因此, 脱水敏感性很可能是由脱水耐性经多次独立的进化而形成。

8 贮存技术

由于顽拗性种子的不耐脱水性, 成熟脱落时代谢相对活跃, 脱离母体后的生长状态不断变化, 因此种子采收后要采用严格的保存机制来维持其活力。Berjak 等提出短(中)期贮存方法, 包括吸涨贮藏法或水浸贮藏法、部分脱水室温贮藏法、气调法等, 就是在保持种子活力的前提下, 将其保存在所能承受的最低温度下, 避免水分丧失, 并防止微生物的侵染^[52], 可使顽拗性种子的寿命延长至数月, 甚至数年^[71]。如 *Trichilia dregeana* 顽拗性种子在生长期未完成前脱落, 能在约 16℃ 的最佳贮藏条件下保存数月, 才出现明显的萌发状态^[72]。不同的顽拗性种子植物的遗传特点与生境并不相同, 因此耐寒程度也有很大差异, 这种方法并不适合所有的顽拗性种子。一些具有休眠特性的顽拗性种子可采用层积砂藏的方法保存, 在休眠期内为种子提供水分, 短期内可保持种子活力, 如龙眼(*Dimocarpus longan*)^[73]、三七等种子。尽管短(中)期贮存方法可有效延长一些顽拗性种子的贮藏寿命, 但是贮藏期间种子萌发还是会不可避免地发生。

Roberts 等提出贮藏顽拗性种子最有效的方法是液氮法, 在低含水量下, 种子能在 -196℃ 下不受伤害^[74]。因为大部分顽拗性种子个体很大, 脱落时都保持着较高的含水量, 所以此法也不适合所有顽拗性种子。大粒顽拗性种子不易实现快速脱水, 且缓慢脱水和降温对种子是致命的, 因此, 种子含水量必须达到在低温下非结冰化状态, 才能实现超低温贮藏。小粒的顽拗性种子通常能够实现超低温贮藏, 因为这类种子易完成快速脱水过程, 如印度楝(*Azadirachta indica*) 和山葵菜(*Wasabia japonica*) 顽拗性种子就实现了超低温贮藏^[75-76]。理论上如果顽拗性种子超低温贮藏后, 能够完成解冻和再水合过程, 种子就可以不受干预地在试管内完成萌发。但大部分顽拗性种子体型过大, 需要切取胚轴作为外植体进行超低温保存, 且离体胚体积较小, 易于在短期内脱水, 胚本身具有较强的抗逆性。文彬报道蒲葵(*Livistona chinensis*) 种胚经超低温保存 2 a 后, 胚的活力几乎不发生改变; 而且胚的活力变化与细胞超微结构与原生质完整性所遭受的破坏有关^[77-78]。郑郁善等报道板栗(*Castanea mollissima*) 种子进行低温预处理(0℃~5℃)后再进行超低温保存可以提高存活率, 低温预处理可使种子进行低温锻炼^[79]。好的防冻剂组合能够降低保存材料的冰点

温度, 缓解超低温保存的冷冻伤害, 使其最佳含水量范围更广^[80]。近年来对顽拗性种子超低温保存的关键技术也进行了研究, 如降低顽拗性种子脱水过程中的氧化胁迫伤害; 通过部分脱水和快速冷冻及后续加温等措施来解决顽拗性种质资源长期在低温和低含水量状态的贮存问题^[81]。

9 展望

正常性种子和顽拗性种子都是植物适应不同的自然环境而进化出的不同特性。植物种子的脱水耐性作为一种重要的进化特征, 它是由多种因素共同作用的结果。脱水敏感性种子多产自于热带、亚热带湿润地区, 多为大粒种子, 并逐渐进化出一套与其生境紧密契合的生理生态适应机制, 其脱水敏感性部分原因是由于抗氧化系统失效造成的, 但脱水耐性的丧失也是一种选择进化优势, 同样反映了这一地区植物的典型特征。如果能够确定种子顽拗性是否为原始性状, 就可以为现存的种子植物起源地的推断提供判断依据^[82]。超低温保存是目前顽拗性种子最为有效的种质保存技术之一。

近年来, 对顽拗性种子的研究虽已取得一些进展, 但在很多方面并不清楚, 因此, 未来可从以下几个方面深入研究:

(1) 顽拗性种子生境调查研究。植物自然属性是与其生长环境不断适应的结果, 反映了该地区生态环境的特征。因此, 仍需继续深入研究顽拗性种子贮藏特性与其自然生境的关系, 了解顽拗性种子的遗传本质, 不断更新建立顽拗性种子的植物数据库, 对其科属分类和地理生境分布进行综合分析, 这是顽拗性种子研究工作的重要环节。

(2) 微观形态学研究。顽拗性种子脱水耐性的丧失是复杂的进化过程, 前人在种子生理学、顽拗性种子脱水机理与微观形态学等方面已开展了相关研究, 尤其是对顽拗性种子在超低温保存下的超微结构研究^[78,83]; Berjak 等的最新研究揭示了顽拗性种子种胚细胞壁在生长和脱水过程中的保护特性^[84]。但一些关键问题仍然有待进一步探索, 在顽拗性种子生理生化研究的基础上, 结合微观形态学, 综合分析顽拗性种子的脱水敏感性。

(3) 分子生物学研究。正常性种子蛋白质组的研究已获得许多突破性进展^[85], 对于顽拗性种子应用分子生物学技术进行的研究起步较晚, 尤其是在脱水修复的分子机制方面。今后可以利用传统分类

方法结合分子遗传学对顽拗性种子性状进行研究, 运用分子生物学技术提高顽拗性种子的脱水耐性, 探索转基因技术对种子脱水耐性的影响, 通过基因组和蛋白质组研究顽拗性种子萌发、休眠和脱水机制, 挖掘影响脱水敏感性的相关基因, 掌握其表达特性和代谢调控通路。通过基因组学研究顽拗性种子植物的原始种, 逐步推断其进化机制和进化地位, 从而明确影响种子顽拗性的关键基因。另外, 通过分子生物学手段掌握有效的顽拗性种子诱导(解除)休眠技术, 以解决顽拗性种子不耐贮藏等在农业生产中的实际问题。

(4) 顽拗性种子贮存技术。产生顽拗性种子的植物多为重要的经济类作物, 其贮存技术是保证植物种族延续的关键环节。虽然超低温保存技术在 800~1000 种(不包含超低温保存的正常性种子)高等植物材料中成功实现, 但该技术仍然存在众多技术难点, 应用并不广泛, 特别是众多起源于热带的典型顽拗性种子并不适用于超低温保存^[86]。因此对于顽拗性种子的贮存技术仍需进一步探索, 今后可根据植物种子的生理特性、生长阶段、可保存器官等方面制定具体的顽拗性种子贮存方案。

顽拗性种子是种子科学研究领域的重要课题, 目前仍存在着众多尚未攻克的难题。研究顽拗性种子不仅对于了解种子的脱水机制具有重要的理论意义, 而且还关系到农业生产实践的诸多现实方面。因此, 进一步系统性的研究顽拗性种子的生理特性、生态进化、分子生物学和保存技术等方面, 可为找到最佳的种质保存方法提供科学依据, 将为种子顽拗性的研究开辟新的前景。

参考文献

- [1] ROBERTS E H. Predicting the storage life of seeds [J]. *Seed Sci Techn*, 1973, 1: 499-514.
- [2] SMITH M T, BERJAK P. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerance and desiccation-sensitive seeds [M]// KIGEL J, GALILI G. *Seed Development and Germination*. New York: Marcel Dekker Inc., 1995: 701-746.
- [3] PAMMENTER N W, BERJAK P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms [J]. *Seed Sci Res*, 1999, 9(1): 13-37. doi: 10.1017/S0960258599000033.
- [4] TAO J L. *Seedbank Management and Seed Storage* [M]. Roman: IBPGR & CAAS, 1986: 1-70.
- [5] TAO J L, ZHENG G H. *Seed Vigour* [M]. Beijing: Science Press, 1991: 1-262.

- [6] FU J R. Recalcitrant seed [J]. *Plant Physiol Commun*, 1991, 27(6): 402–406.
傅家瑞. 顽拗性种子 [J]. *植物生理学通讯*, 1991, 27(6): 402–406.
- [7] FARRANT J M, PAMMENTER N W, BERJAK P. Recalcitrant: A current assessment [J]. *Seed Sci Techn*, 1988, 16: 155–166.
- [8] FARRANT J M, PAMMENTER N W, BERJAK P, et al. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance [J]. *Seed Sci Res*, 1997, 7(2): 135–144. doi: 10.1017/S0960258500003470.
- [9] BONNER F T. Storage of seeds: Potential and limitations for germplasm conservation [J]. *For Ecol Manage*, 1990, 35(1/2): 35–43. doi: 10.1016/0378-1127(90)90230-9.
- [10] ELLIS R H, HONG T D, ROBERTS E H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee [J]. *J Exp Bot*, 1990, 41(9): 1167–1174. doi: 10.1093/jxb/41.9.1167.
- [11] ELLIS R H, HONG T D, ROBERTS E H. An intermediate category of seed storage behaviour? II. Effects of provenance, immaturity and imbibition on desiccation-tolerance in coffee [J]. *J Exp Bot*, 1991, 42(5): 653–657. doi: 10.1093/jxb/42.5.653.
- [12] WEN B. On the compound quantitative characteristic trait of seed recalcitrance [J]. *Acta Bot Yunnan*, 2008, 30(1): 76–88. doi: 10.3969/j.issn.2095-0845.2008.01.012.
文彬. 试论种子顽拗性的复合数量性状特征 [J]. *云南植物研究*, 2008, 30(1): 76–88. doi: 10.3969/j.issn.2095-0845.2008.01.012.
- [13] BERJAK P, PAMMENTER N W. Recalcitrance is not an all or nothing situation [J]. *Seed Sci Res*, 1994, 4(2): 263–264. doi: 10.1017/S0960258500002257.
- [14] BERJAK P, PAMMENTER N W. Seed recalcitrance current perspectives [J]. *S Afr J Bot*, 2001, 67(2): 79–89.
- [15] YANG Q H, YIN X J, YE W H, et al. Biological characteristics of recalcitrant-type seeds and evolution of seed recalcitrance [J]. *Chin J Ecol*, 2006, 25(1): 79–86.
杨期和, 尹小娟, 叶万辉, 等. 顽拗型种子的生物学特性及种子顽拗性的进化 [J]. *生态学杂志*, 2006, 25(1): 79–86.
- [16] HONG T D, ELLIS R H. A protocol to determine seed storage behaviour [M]// ENGELS J M. *IPGRI Technical Bulletin*, No. 1. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996: 1–51.
- [17] HOFMANN P, STEINER A M. An update list of recalcitrant seeds [J]. *Landwirtschaftl Forsch*, 1989, 42(4): 310–323.
- [18] FARNSWORTH E. The ecology and physiology of viviparous and recalcitrant seeds [J]. *Annu Rev Ecol Syst*, 2000, 31(1): 107–138. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.31.1.107.
- [19] TWEDDLE J C, DICKIE J B, BASKIN C C, et al. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity [J]. *J Ecol*, 2003, 91(2): 294–304. doi: 10.1046/j.1365-2745.2003.00760.x.
- [20] PAMMENTER N W, BERJAK P. Some thoughts on the evolution and ecology of recalcitrant seeds [J]. *Plant Spec Biol*, 2000, 15(2): 153–156. doi: 10.1046/j.1442-1984.2000.00035.x.
- [21] PRITCHARD H W, TOMPSETT P B, MANGER R K. Development of a thermal time model for the quantification of dormancy loss in *Aesculus hippocastanum* seeds [J]. *Seed Sci Res*, 1996, 6(3): 127–135. doi: 10.1017/S0960258500003147.
- [22] DAWS M I, BURSLEM D F R P, CRABTREE L M, et al. Differences in seed germination responses may promote coexistence of four sympatric *Piper* species [J]. *Funct Ecol*, 2002, 16(2): 258–267. doi: 10.1046/j.1365-2435.2002.00615.x.
- [23] HONG T D, LININGTON S, ELLIS R H. *Compendium of Information on Seed Storage Behaviour*, Vol. I & II [M]. UK: Royal Botanic Gardens, 1998: 901–921.
- [24] DICKIE J B, PRITCHARD H W. *Systematic and evolutionary aspects of desiccation tolerance in seeds* [M]// Black M, Pritchard H W. *Desiccation and Survival in Plants: Drying without Dying*. UK: CAB International, Wallingford, 2002: 239–259. doi: 10.1079/9780851995342.0239.
- [25] LEISHMAN M R, WESTOBY M. The role of large seed size in shaded conditions: experimental evidence [J]. *Funct Ecol*, 1994, 8(2): 205–214. doi: 10.2307/2389903.
- [26] LEISHMAN M R, WESTOBY M. The role of seed size in seedling establishment: Experimental evidence from semiarid species [J]. *J Ecol*, 1994, 82(2): 249–258. doi: 10.2307/2261293.
- [27] HARMS K E, DALLING J W. Damage and herbivory tolerance through resprouting as an advantage of large seed size in tropical trees and lianas [J]. *J Trop Ecol*, 1997, 13(4): 617–621. doi: 10.1017/S0266467400010750.
- [28] BOOT R G. The significance of seedling size and growth rate of tropical rainforest tree seedlings for regeneration in canopy openings [M]// SWAINE M D. *The Ecology of Tropical Forest Tree Seedlings*. Paris: UNESCO, 1996: 267–283.
- [29] CURRAN L M, WEBB C O. Experimental tests of the spatiotemporal scale of seed predation in mast fruiting *Dipterocarpaceae* [J]. *Ecol Monogr*, 2000, 70(1): 129–148. doi: 10.1890/0012-9615(2000)070[0129:ETOTSS]2.0.CO;2.
- [30] TOMSETT P B, KEMP R. *Database of Tropical Tree Seed Research with Special Reference to the Dipterocarpaceae, Meliaceae and Araucariaceae: User Manual* [M]. Kew: Royal Botanic Gardens, 1996: 257–264.
- [31] TOMPSETT P B. Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed [J]. *Ann Appl Biol*, 1984, 105(3): 581–586. doi: 10.1046/j.1365-2745.2003.00760.x.

- 10.1111/j.1744-7348.1984.tb03085.x.
- [32] PRITCHARD H W, DAWS M I, FLETCHER B J, et al. Ecological correlates of seed desiccation tolerance in tropical African dryland trees [J]. *Amer J Bot*, 2004, 91(6): 863–870. doi: 10.3732/ajb.91.6.863.
- [33] HONG T D, ELLIS R H. *Ex situ* biodiversity conservation by seed storage: multiple-criteria keys to estimate seed storage behaviour [J]. *Seed Sci Techn*, 1997, 25(1): 157–161.
- [34] XIA K, DAWS M I, STUPPY W, et al. Rates of water loss and uptake in recalcitrant fruits of *Quercus* species are determined by pericarp anatomy [J]. *PLOS ONE*, 2012, 7(10): e47368. doi: 10.1371/journal.pone.0047368.
- [35] SONG S Q, FU J R. Regulation of seed germination and dormancy [J]. *Chin Bull Bot*, 1993, 10(4): 1–10.
宋松泉, 傅家瑞. 种子萌发和休眠的调控 [J]. *植物学通报*, 1993, 10(4): 1–10.
- [36] GOMES M P, GARCIA Q S. Reactive oxygen species and seed germination [J]. *Biologia*, 2013, 68(3): 351–357. doi: 10.2478/s11756-013-0161-y.
- [37] LIU Y, QIU Y P, ZHANG L, et al. Dormancy breaking and storage behavior of *Garcinia cowa* Roxb. (Guttiferae) seeds: Implication for ecological function and gemplasm conservation [J]. *J Integr Plant Biol*, 2005, 47(1): 38–49. doi: 10.1111/j.1744-7909.2005.00010.x.
- [38] BASKIN J M, BASKIN C C. A classification system for seed dormancy [J]. *Seed Sci Res*, 2004, 14(1): 1–16. doi: 10.1079/SSR.2003150.
- [39] AN N. Studies on fruit development and seed after-ripening characteristics of *Panax notoginseng* [D]. Kunming: Yunnan Agriculture University, 2006: 1–57. doi: 10.7666/d.y1005460.
安娜. 三七果实发育和种子后熟特性研究 [D]. 昆明: 云南农业大学, 2006: 1–57. doi: 10.7666/d.y1005460.
- [40] BERJAK P, DINI M, PAMMENTER N W. Possible mechanisms underlying the differing dehydration responses in recalcitrant and orthodox seeds: Desiccation associated subcellular changes in propagules of *Avicennia marina* [J]. *Seed Sci Techn*, 1990, 18(2): 297–310.
- [41] FARRANT J M, BERJAK P, PAMMENTER N W. Proteins in development and germination of a desiccation sensitive (recalcitrant) seed species [J]. *Plant Growth Regul*, 1992, 11(3): 257–265. doi: 10.1007/BF00024564.
- [42] SONG S Q, CHENG H Y, JIANG X C, et al. *Seed Biology* [M]. Beijing: Science Press, 2008: 302–307.
宋松泉, 程红焱, 姜孝成, 等. *种子生物学* [M]. 北京: 科学出版社, 2008: 302–307.
- [43] GALAU G A, JAKOBSEN K S, HUGHES D W. The controls of late dicot embryogenesis and early germination [J]. *Physiol Plant*, 1991, 81(2): 280–288. doi: 10.1111/j.1399-3054.1991.tb02142.x.
- [44] FARRANT J M, PAMMENTER N W, BERJAK P. Seed development in relation to desiccation tolerance: A comparison between desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation tolerant types [J]. *Seed Sci Res*, 1993, 3(1): 1–13. doi: 10.1017/S0960258500001513.
- [45] FINCH-SAVAGE W E. Seed development in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: Development of germinability and desiccation tolerance [J]. *Seed Sci Res*, 1992, 2(1): 17–22. doi: 10.1017/S0960258500001069.
- [46] PAMMENTER N W, BERJAK P, WALTERS C. The effect of drying rate on recalcitrant seeds: 'lethal water content', causes of damage, and quantification of recalcitrance [M]// BLACK M J, BRADFORD K J, VÁZQUEZ-RAMOS J. *Seed Biology: Advances and Applications*. Mexico: Merida, 2000: 215–221. doi: 10.1079/9780851994048.0215.
- [47] LEPRINCE O, HENDRY G A F, ATHERTON N M, et al. Free radicals and metabolism associated with the acquisition and loss of desiccation tolerance in developing seeds [J]. *Biochem Soc Trans*, 1996, 24(2): 451–455.
- [48] HENDRY G A F. Oxygen, free radical processes and seed longevity [J]. *Seed Sci Res*, 1993, 3(3): 141–153. doi: 10.1017/S0960258500001720.
- [49] SMIRNOFF N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation [J]. *New Phytol*, 1993, 125(1): 27–58. doi: 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03863.x.
- [50] VARGHESE B, NAITHANI S C. Desiccation-induced changes in lipid peroxidation, superoxide level and antioxidant enzymes activity in neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds [J]. *Acta Physiol Plant*, 2002, 24(1): 79–87. doi: 10.1007/s11738-002-0025-5.
- [51] BAILLY C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology [J]. *Seed Sci Res*, 2004, 14(2): 93–107. doi: 10.1079/SSR2004159.
- [52] BERJAK P, PAMMENTER N W. From *Avicennia* to *Zizania*: Seed recalcitrance in perspective [J]. *Ann Bot*, 2007, 101(2): 213–228. doi: 10.1093/aob/mcm168.
- [53] HENDRY G A F, FINCH-SAVAGE W E, THORPE P C, et al. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. [J]. *New Phytol*, 1992, 122(2): 273–279. doi: 10.1111/j.1469-8137.1992.tb04231.x.
- [54] VARGHESE B, SERSHEN, BERJAK P, et al. Differential drying rates of recalcitrant *Trichilia dregeana* embryonic axes: A study of survival and oxidative stress metabolism [J]. *Physiol Plant*, 2011, 142(4): 326–338. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01469.x.

- [55] WU X J, SONG S Q, QIAN C M, et al. Effects of drying at different rates on desiccation sensitivity and membrane lipid peroxidation in Chinese wampee [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels] Axes [J]. *Acta Phytophysiol Sin*, 2001, 27(5): 407–412. doi: 10.3321/j.issn:1671-3877.2001.05.008.
伍贤进, 宋松泉, 钱春梅, 等. 脱水速率对黄皮胚轴脱水敏感性及其膜脂过氧化的影响 [J]. *植物生理学报*, 2001, 27(5): 407–412. doi: 10.3321/j.issn:1671-3877.2001.05.008.
- [56] FARRANT J M, BERJAK P, PAMMENTER N W. The effect of drying rate on viability retention of propagules of *Avicennia marina* [J]. *S Afr J Bot*, 1985, 51(6): 432–438.
- [57] YAN X F, CAO M. Sensitivity of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. seed to different desiccation [J]. *Plant Physiol Commun*, 2008, 44(2): 243–246.
闫兴富, 曹敏. 橡胶树种子对脱水的敏感性 [J]. *植物生理学通讯*, 2008, 44(2): 243–246.
- [58] YAN X F, DU Q, WANG J L, et al. Effects of dehydrating treatments on seeds germination of *Ligustrum obtusifolium* [J]. *Seed*, 2009, 28(7): 93–96. doi: 10.3969/j.issn.1001-4705.2009.07.028.
闫兴富, 杜茜, 王建礼, 等. 脱水处理对水蜡树种子萌发的影响 [J]. *种子*, 2009, 28(7): 93–96. doi: 10.3969/j.issn.1001-4705.2009.07.028.
- [59] WESLEY-SMITH J, PAMMENTER N W, BERJAK P, et al. The effects of two drying rates on the desiccation tolerance of embryonic axes of recalcitrant Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) seeds [J]. *Ann Bot*, 2001, 88(4): 653–664. doi: 10.1006/anbo.2001.1519.
- [60] WATERS C, PAMMENTER N W, BERJAK P, et al. Desiccation damage, accelerate ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds [J]. *Seed Sci Res*, 2001, 11(2): 135–148. doi: 10.1079/SSR200168.
- [61] FU J R, SONG S Q. Advances in study on desiccation tolerance of seeds [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2001, 9(4): 345–354.
傅家瑞, 宋松泉. 种子耐脱水性的研究 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2001, 9(4): 345–354.
- [62] INGRAM J, BARTELS D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47: 377–403. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.377.
- [63] BERJAK P. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms [J]. *Seed Sci Res*, 2006, 16(1): 1–15. doi: 10.1079/SSR2005236.
- [64] FINCH-SAVAGE W E, BLAKE P S. Indeterminate development in desiccation-sensitive seeds of *Quercus robur* L. [J]. *Seed Sci Res*, 1994, 4(2): 127–133. doi: 10.1017/S0960258500002129.
- [65] FARRANT J M, PAMMENTER N W, BERJAK P, et al. Presence of dehydrin-like proteins and levels of abscisic acid in recalcitrant (desiccation sensitive) seeds may be related to habitat [J]. *Seed Sci Res*, 1996, 6(4): 175–182. doi: 10.1017/S0960258500003238.
- [66] GEE O H, PROBERT R J, COOMBER S A. ‘Dehydrin-like’ proteins and desiccation tolerance in seeds [J]. *Seed Sci Res*, 1994, 4(2): 135–141. doi: 10.1017/S0960258500002130.
- [67] DELAHAIE J, HUNDERTMARK M, BOVE J, et al. LEA polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals ABI3-regulated LEA protein abundance linked to desiccation tolerance [J]. *J Exp Biol*, 2013, 64(14): 4559–4573. doi: 10.1093/jxb/ert274.
- [68] CÔME D, CORBINEAU F. Metabolic damage related to desiccation sensitivity [M]// OUÉDRAOGA A S, POULSEN K, STUBSGAARD F. *Intermediate/recalcitrant Tropical Forest Tree Seeds*. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996: 83–97.
- [69] FLYNN S, TURNER R M, STUPPY W H. *Seed Information Database (release 7.0)* [DB/OL]. 2006. <http://www.kew.org/data/sid>.
- [70] von TEICHMAN I, van WYK A E. Structural aspects and trends in the evolution of recalcitrant seeds in dicotyledons [J]. *Seed Sci Res*, 1994, 4(2): 225–239. doi: 10.1017/S096025850000221X.
- [71] GOVEIA M, KIOKO J I, BERJAK P. Developmental status is a critical factor in the selection of excised recalcitrant axes as explants for cryopreservation: A study on *Trichilia dregeana* Sond [J]. *Seed Sci Res*, 2004, 14(2): 241–248. doi: 10.1079/SSR2004173.
- [72] CHIN H F. *Recalcitrant Seeds, Extension bulletin 288* [M]. Taipei: Food & Fertilizer Technology Center, 1998: 1–17.
- [73] CHIN H F, HOR Y L, MOHD L M B. Identification of recalcitrant seeds [J]. *Seed Sci Techn*, 1984, 12(2): 429–436.
- [74] ROBERTS E H. Problems of longterm storage of seed and pollen for genetic resources conservation [M]// FRANKEL O H, HAWKES J G. *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*. London: Cambridge University Press, 1975: 269–294.
- [75] BERJAK P, DUMET D. Cryopreservation of seeds and isolated embryonic axes of neem (*Azadirachta indica*) [J]. *Cryo-Letters*, 1996, 17(2): 99–104.
- [76] POTTS S E, LUMPKIN T A. Cryopreservation of *Wasabia* spp. seeds [J]. *Cryo-letters*, 1997, 18(3): 185–190.
- [77] WEN B, WANG R L. Pretreatment incubation for culture and cryopreservation of *Sabal* embryos [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2010, 102(2): 237–243. doi: 10.1007/s11240-010-9727-3.
- [78] WEN B. Cytological and physiological changes related to cryotolerance in recalcitrant *Livistona chinensis* embryos during seed development [J]. *Protoplasma*, 2011, 248(3): 483–491. doi: 10.1007/s00709-010-0188-7.

- [79] ZHENG Y S. Studies on the ABA sensitivity during the development of *Castanea mollissima* and *C. henryi* seeds [J]. *Sci Silv Sin*, 1998, 34(4): 1–7.
郑郁善. 板栗和锥栗种子发育过程中ABA生理效应的研究 [J]. 林业科学, 1998, 34(4): 1–7.
- [80] TANG A J, LONG C L, DAO Z L. Molecular mechanisms and storage technologies of recalcitrant seeds [J]. *Acta Bot Boreali-Occid Sin*, 2004, 24(11): 2170–2176. doi: 10.3321/j.issn:1000-4025.2004.11.037.
唐安军, 龙春林, 刀志灵. 种子顽拗性的形成机理及其保存技术 [J]. 西北植物学报, 2004, 24(11): 2170–2176. doi: 10.3321/j.issn:1000-4025.2004.11.037.
- [81] PATRICIA B, PAMMENTER N W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds [J]. *Front Plant Sci*, 2013, 4: 478. doi:10.3389/fpls.2013.004.478.
- [82] TIAN W R, SONG S Q, FU J R. Advances in ecology of recalcitrant seeds [J]. *J Grad Sun Yat-Sen Univ (Nat Sci Med)*, 2002, 23(4): 88–96.
田问荣, 宋松泉, 傅家瑞. 顽拗性种子生态学研究进展 [J]. 中山大学研究生学刊: 自然科学、医学版, 2002, 23(4): 88–96.
- [83] SERSHEN, BERJAK P, PAMMENTER N W, et al. Rate of dehydration, state of subcellular organisation and nature of cryoprotection are critical factors contributing to the variable success of cryopreservation: Studies on recalcitrant zygotic embryos of *Haemanthus montanus* [J]. *Protoplasma*, 2012, 249(1): 171–186. doi: 10.1007/s00709-011-0275-4.
- [84] WOODENBERG W R, PAMMENTER N W, FARRANT J M, et al. Embryo cell wall properties in relation to development and desiccation in the recalcitrant-seeded *Encephalartos natalensis* (Zamiaceae) dyer and verdoorn [J]. *Protoplasma*, 2015, 252(1): 245–258. doi: 10.1007/s00709-014-0672-6.
- [85] HUANG H, JIANG X C, CHENG H Y, et al. Progress of study of seed proteomes [J]. *Chin Bull Bot*, 2008, 25(5): 597–607. doi: 10.3969/j.issn.1674-3466.2008.05.013.
黄荟, 姜孝成, 程红焱, 等. 种子蛋白质组的研究进展 [J]. 植物学通报, 2008, 25(5): 597–607. doi: 10.3969/j.issn.1674-3466.2008.05.013.
- [86] WEN B. An introduction to cryopreservation of plant germplasm [J]. *Plant Divers Res*, 2011, 33(3): 311–329.
文彬. 植物种质资源超低温保存概述 [J]. 植物分类与资源学报, 2011, 33(3): 311–329.