



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107114031 B

(45) 授权公告日 2021.04.09

(21) 申请号 201710330337.2

(22) 申请日 2017.05.11

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107114031 A

(43) 申请公布日 2017.09.01

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所  
地址 650201 云南省昆明市蓝黑路132号

(72) 发明人 杨娟 胡泉剑 杜燕 刘成  
何华杰 杨娅娟 李慧 杨湘云

(74) 专利代理机构 昆明盛鼎宏图知识产权代理  
事务所(特殊普通合伙)  
53203

代理人 许竞雄

(51) Int. Cl.

A01C 1/00 (2006.01)

(56) 对比文件

Jennifer Crane等.Triacylglycerols  
determine the unusual storage physiology  
of Cuphea seed.《Planta》.2003,第217卷

审查员 安燕

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种提高低温保存后尼泊尔野桐种子胚乳  
活力的方法

(57) 摘要

一种提高低温保存后尼泊尔野桐种子胚乳活力的方法,包括:将-18℃至-20℃低温保存的干燥种子连同存放种子的密闭容器取出;在温度为15℃、相对湿度15%的环境中放置24小时,取出种子;将种子放置在温度为45℃的培养箱中,热处理6小时后取出。种子恢复到室温后放置于1%的琼脂培养基上,置于20℃培养间24小时;处理后的种子切破种皮及胚乳,浸泡于1%的氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液中,放置于30℃黑暗条件下48小时;取出浸泡后的种子切开观测胚乳染色情况,具有活力的胚乳显示均匀的红色。该方法显著提高了不同产地,低温下储存不同时间的尼泊尔野桐种子的胚乳活力。解决了尼泊尔野桐种子低温保藏后胚乳活力降低的问题。

1. 一种提高低温保存后尼泊尔野桐种子胚乳活力的方法,其特征在于:该方法包括如下步骤:

(1) 将在-18℃至-20℃低温保存后的干燥种子连同储存种子的密闭容器取出,在温度为15℃,相对湿度15%的环境中放置24小时回温;

(2) 将回温后的种子放置在温度为45℃的培养箱中,热处理6小时后取出;

(3) 将步骤(2)处理后的种子取出,待种子温度恢复到室温后放置于1%的琼脂培养基上,放置于20℃培养间24小时;

(4) 将上述步骤(3)处理后的种子切破种皮及胚乳;

(5) 将上述步骤(4)处理后的种子浸泡于1%的氯化三苯基四氮唑溶液中,放置于30℃黑暗条件下48小时;

(6) 将上述步骤(5)处理后的种子切开观测胚乳染色情况,具有活力的胚乳显示均匀的红色。

2. 根据权利要求1所述的一种提高低温保存后尼泊尔野桐种子胚乳活力的方法,其特征在于:所述步骤(1)在-18℃至-20℃冷藏保存的种子是采集成熟饱满的种子,先将种子置于温度为15℃、相对湿度15%的环境中直到种子的平衡相对湿度达到15%,种子含水量低于10%时,再将种子放入密闭容器中,保存于-18℃至-20℃。

3. 根据权利要求1所述的一种提高低温保存后尼泊尔野桐种子胚乳活力的方法,其特征在于:该方法是采集成熟饱满的种子,将种子置于温度为15℃、相对湿度15%的环境中,至种子的平衡相对湿度达到15%时,将种子放入密闭容器,保存于-18℃至-20℃中;根据需要在一段时间后将装有种子的密闭容器取出,在温度为15℃、相对湿度15%的环境中放置24小时回温;随后将种子从容器中取出,放置在温度为45℃的培养箱中,热处理6小时后,将处理后的种子取出,待种子温度恢复到室温后放置于1%的琼脂培养基上,放置于20℃培养间24小时;处理后的种子切破种皮及胚乳,浸泡于1%的氯化三苯基四氮唑溶液中,放置于30℃黑暗条件下48小时;取出种子切开观测胚乳染色情况,具有活力的胚乳显示均匀的红色。

## 一种提高低温保存后尼泊尔野桐种子胚乳活力的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于植物种质资源保存技术领域,具体地,涉及一种提高低温(-18℃至-20℃)保存后尼泊尔野桐种子胚乳活力的方法。

### 背景技术

[0002] 尼泊尔野桐(*Mallotus nepalensis* Müll.Arg.)是大戟科(Euphorbiaceae)野桐属(*Mallotus* Lour.)落叶灌木或小乔木树种。分布于西藏云南海拔1700到2500米的山坡或沟谷中,国外主要分布在不丹、印度东北、缅甸及尼泊尔,国内研究报道较少,国外有报道其提取物具有温和抑制中枢神经的作用。未见尼泊尔野桐种子储藏方面的研究报道。

[0003] 将正常型种子干燥后低温(-18℃至-20℃)保藏可以极大的延长其寿命,这在国际上已经形成共识,并且基于这一理论建立了多个农作物及野生植物种子库;但一些植物的种子在冷藏后胚乳的活力会发生变化,而胚乳也是一种重要的种质资源,并且是天然的三倍体育种材料。因此提高及改善低温冷藏后种子胚乳的活力对于长期高效保存及合理利用植物种质资源有着重要的意义。

[0004] 目前对种子进行活力检测的方法主要有萌发及氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法(也叫TZ染色法)。在保存实践中本发明发现冷藏后尼泊尔野桐种子几乎不能萌发,对其进行TTC染色后发现,胚可以被染成红色,而胚乳不能染色;因此本发明判断可能是由于胚乳在冷藏过程中发生某种变化而导致的活力下降,进而影响种子的整体活力及萌发率;为此发明了本发明的方法,用以提高胚乳的活力。胚乳活力的评价办法以TTC染色为主,辅以种子萌发率为参考,以保证实验结果的严谨性及可信度。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于针对现有技术中在低温(-18℃至-20℃)保存一段时间后的尼泊尔野桐种子胚乳活力大幅下降甚至几乎完全丧失的技术难题,提供一种简便高效提高低温保存后尼泊尔野桐种子胚乳活力的方法。为实现该物种的长期有效保存,特别是胚乳这种天然的三倍体种质资源的长期有效保存及高效利用提供技术支持。

[0006] 为了实现本发明的上述目的,本发明提供了如下的技术方案:

[0007] 一种提高低温保存后尼泊尔野桐种子胚乳活力的方法,包括如下步骤:

[0008] (1) 将在-18℃至-20℃冷藏保存后的种子连同其密闭容器取出,在温度为15℃、相对湿度15%的环境中放置24小时回温;

[0009] (2) 将回温后的种子从密闭容器中取出,放置在温度为45℃的培养箱中,热处理6小时后取出;

[0010] (3) 将步骤(2)处理后的种子取出,待种子温度恢复到室温后放置于1%的琼脂培养基上,放置于20℃培养间24小时;

[0011] (4) 将上述步骤(3)处理后的种子切破种皮及胚乳;

[0012] (5) 将上述步骤(4)处理后的种子浸泡于1%的氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液中,放

置于30℃黑暗条件下48小时；

[0013] (6)将上述步骤(5)处理后的种子切开观测胚乳染色情况,具有活力的胚乳显示均匀红色。

[0014] 根据所述的一种提高低温保存后尼泊尔野桐种子胚乳活力的方法,其中所述步骤(1)在-18℃至-20℃冷藏保存的种子是采集成熟饱满的种子,先将种子置于温度为15℃、相对湿度15%的环境中直到种子的平衡相对湿度达到15% (此时种子的含水量通常低于10%),然后再将种子放入密闭容器中,保存于-18℃至-20℃。

[0015] 本发明为一种提高低温保存后尼泊尔野桐种子胚乳活力的方法,更具体的步骤是:

[0016] 采集成熟饱满的种子,将种子置于温度为15℃、相对湿度15%的环境中,至种子的平衡相对湿度达到15%时,将种子放入密闭容器,保存于-18℃至-20℃中;种子保存一段时间后,将装有种子的密闭容器取出,在温度为15℃、相对湿度15%的环境中放置24小时回温;随后将种子从容器中取出,放置在培养箱温度为45℃的培养箱中,热处理6小时后取出,待种子温度恢复到室温后放置于1%的琼脂培养基上,放置于20℃培养间24小时;处理后的种子切破种皮及胚乳,浸泡于1%的氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液中,放置于30℃黑暗条件下48小时;取出种子切开观测胚乳染色情况,具有活力的胚乳显示均匀的红色。

### 具体实施方式

[0017] 下面用本发明实施例来进一步说明本发明的实质性内容,但并不以此来限定本发明。

[0018] 实施例1:

[0019] 1.材料和方法:

[0020] 1.1研究材料:

[0021] 2014年10月,安徽黄山徽州区富溪乡新田村采集成熟的新鲜尼泊尔野桐(*Mallotus nepalensis*)种子。采集后运回昆明植物研究所西南野生生物种质资源库种子保藏中心。

[0022] 1.2研究方法:

[0023] 1.2.1干燥冷藏及冷藏后的回温:将1.1步骤采集到的种子置于15℃,15%相对湿度的干燥间中干燥。定期以Rotronic Ltd.公司生产的Hygrolab C1unit相对湿度测定仪结合同一公司生产的Rotronic HC 2-AW探头对种子相对湿度进行测定,待平衡相对湿度达到15%后装入密闭的容器中。2015年9月14日将装有种子的密闭容器放入-18℃至-20℃冷藏。冷藏处理1年后将装有种子的密闭容器取出。放入15℃,15%相对湿度的干燥间中24小时回温后打开装有种子的容器,随机取出实验所需种子。

[0024] 1.2.2实验设计:将种子分为2组处理,分别为对照组和冷藏后热处理组;热处理温度设置为45、60及70℃,时间为6个小时。每个处理3个重复,每个重复20粒种子。

[0025] 1.2.3热处理方法:将种子放入培养箱,培养箱温度设定为45、60及70℃。处理6小时后随机取出60粒种子用于检测胚乳活力。对于45及60℃的种子,同时随机取出60粒做萌发实验,以萌发率佐证热处理对胚乳活力的影响。

[0026] 1.2.4TTC染色:待热处理后的种子温度恢复到室温,将种子放置于1%的琼脂培养

基上,放置于20℃培养间24小时;取出种子切破种皮及胚乳,并将种子浸泡于1%的氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液中,放置于30℃黑暗条件下48小时,染色完成后取出种子,用吸水纸吸干表面残余溶液,将种子切开,观测胚乳染色情况,具有活力的胚乳显示均匀的红色。

[0027] 1.2.5萌发:对对照组及冷藏后45及60℃热处理6小时的种子进行萌发实验,以佐证胚乳活力变化。将种子播种于含有200毫克每升赤霉素的1%琼脂培养基上,将培养基装入透明自封袋中防止水分散失,然后置于于20℃的光照培养箱中,光照强度为1000勒克斯,光周期为12小时光照/12小时黑暗。每间隔2-3天检查一次萌发,胚根伸长超过5mm即认为种子萌发,将萌发种子取出,并记录萌发数量;实验开始4周后连续2周无萌发即结束实验。

[0028] 1.2.6数据分析:利用SPSS16.0软件对胚乳染色比例数据进行分析,采用One-Way ANOVA进行方差分析,并用S-N-K法对不同处理时间的染色比例做多重比较。

[0029] 2. 结果

[0030] 2.1热处理对采自安徽黄山冷藏后的尼泊尔野桐种子胚乳活力的影响:

[0031] 表1热处理对冷藏后安徽黄山尼泊尔野桐种子胚乳染色率(%)及萌发率(%)的影响

	冷藏后	45℃	60℃	70℃
[0032] 染色率	4.2±4.2a	47.2±1.4b	41.7±2.4b	31.9±1.4c
萌发率	0	28.3±1.7	35.0±2.9	-

[0033] 注:数字为平均值±标准误,不同字母表示不同处理间的染色率具有显著差异

[0034] 由表1可以看出,-20℃下冷藏1年后未经热处理的种子胚乳染色率只有4.2%,对应的种子萌发率为0;45℃处理6小时后胚乳染色比例即开始升高,萌发率也提高到28.3%,随着温度的上升到60℃,胚乳活力及萌发均未见显著上升,70℃与45及60℃相比胚乳活力有显著下降。

[0035] 综合考虑效果及能耗,本发明选定45℃处理6小时,能有效的提高胚乳活力,并在以下实施例2中采用45℃处理6小时的方法。

[0036] 实施例2:

[0037] 1. 材料和方法:

[0038] 1.1研究材料:

[0039] 2012年9月4日云南省文山州文山县采集成熟的新鲜尼泊尔野桐(*Mallotus nepalensis*)种子。采集后运回昆明植物研究所西南野生生物种质资源库种子保藏中心。

[0040] 1.2研究方法:

[0041] 1.2.1干燥冷藏及冷藏后的回温:将1.1采集到的种子置于15℃,15%相对湿度的干燥间中干燥。定期以Rotronic Ltd.公司生产的Hygrolab Clunit相对湿度测定仪结合同一公司生产的Rotronic HC 2-AW探头对种子相对湿度进行测定,待平衡相对湿度达到15%后装入密闭的容器中。2013年8月6日将装有种子的密闭容器放入-18℃至-20℃冷藏。冷藏3年2个月后将装有种子的容器取出。放入15℃,15%相对湿度的干燥间中24小时回温后打开装有种子的容器,随机取出实验所需种子。

[0042] 1.2.2实验设计:将种子分为2组处理,分别为对照组和热处理组;热处理温度设置45℃,处理6小时。每个处理3个重复,每个重复20粒种子。

[0043] 1.2.3热处理方法:将种子放入培养箱,培养箱温度设定为45℃。处理6小时后取出

60粒种子用于TTC染色实验。

[0044] 1.2.4TTC染色:待热处理后的种子温度恢复到室温,将种子放置于1%的琼脂培养基上,放置于20℃培养间24小时;取出种子切破种皮及胚乳,并将种子浸泡于1%的氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液中,放置于30℃黑暗条件下48小时,染色完成后取出种子,用吸水纸吸干表面残余溶液,将种子切开,观测胚乳染色情况,具有活力的胚乳显示均匀的红色。

[0045] 1.2.6数据分析:利用SPSS16.0软件对胚乳染色率数据进行分析,采用Paired-Samples T Test进行方差分析。

[0046] 2.结果

[0047] 2.1热处理对冷藏后云南文山尼泊尔野桐种子胚乳活力的影响。

[0048] 表2热处理对冷藏后云南文山尼泊尔野桐种子胚乳染色率(%)的影响

	对照	45℃热处理 6 小时
[0049]	0a	42.4±2.9b

[0050] 注:数字为平均值±标准误,不同字母表示不同处理间的染色率具有显著差异

[0051] 由表2可以看出,-20℃下冷藏3年2个月的尼泊尔野桐种子,未经热处理的种子胚乳染色率为0;经45℃热处理后,胚乳染色率提高到42.4%,说明热处理有效提高的-20℃冷藏后的种子胚乳活力。

[0052] 实施例3:

[0053] 1.材料和方法:

[0054] 1.1研究材料:

[0055] 2009年10月08日,云南普洱镇沅九甲乡采集成熟的新鲜尼泊尔野桐(*Mallotus nepalensis*)种子。采集后运回昆明植物研究所西南野生生物种质资源库种子保藏中心。

[0056] 1.2研究方法:

[0057] 1.2.1干燥冷藏及冷藏后的回温:将1.1采集到的种子置于15℃,15%相对湿度的干燥间中干燥。定期以Rotronic Ltd.公司生产的Hygrolab Clunit相对湿度测定仪结合同一公司生产的Rotronic HC 2-AW探头对种子相对湿度进行测定,待平衡相对湿度达到15%后装入密闭的容器中。2011年9月将装有种子的密闭容器放入-18℃至-20℃冷藏。冷藏5年后将装有种子的容器取出。放入15℃,15%相对湿度的干燥间中24小时回温后打开装有种子的容器,根据实验需要随机取出相应数量的种子。

[0058] 1.2.2实验设计:将种子分为2组处理,分别为对照组和热处理组;热处理温度设置45℃,处理6小时。每个处理3个重复,每个重复20粒种子。

[0059] 1.2.3热处理方法:将种子放入培养箱,培养箱温度设定为45℃。处理6小时后取出60粒种子用于TTC染色实验。

[0060] 1.2.4TTC染色:待热处理后的种子温度恢复到室温,将种子放置于1%的琼脂培养基上,放置于20℃培养间24小时;取出种子切破种皮及胚乳,并将种子浸泡于1%的氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液中,放置于30℃黑暗条件下48小时,染色完成后取出种子,用吸水纸吸干表面残余溶液,将种子切开,观测胚乳染色情况,具有活力的胚乳显示均匀的红色。

[0061] 1.2.6数据分析:利用SPSS16.0软件对胚乳染色率数据进行分析,采用Paired-Samples T Test进行方差分析。

[0062] 2.结果与讨论

[0063] 2.1热处理对冷藏后云南普洱尼泊尔野桐种子胚乳染色率的影响。

[0064] 表4热处理对冷藏后云南普洱尼泊尔野桐种子胚乳染色率(%)的影响

	对照	45℃热处理 6 小时
[0065]	0a	48.1±1.9b

[0066] 注:数字为平均值±标准误,不同字母表示不同处理间的染色率具有显著差异

[0067] 由表4可以看出,-20℃下冷藏5年的尼泊尔野桐种子,未经热处理的种子胚乳染色率为0;经45℃热处理后,胚乳染色率达到了48.1%,表明活力得到显著提高。

[0068] 3、本发明的积极效果如下:

[0069] 与现有技术相比,本发明显著提高了不同产地(安徽及云南),干燥后低温(-18℃至-20℃)下储存不同时间(1年、3年2个月及5年)的尼泊尔野桐种子胚乳的活力。较好的解决了尼泊尔野桐种子低温保藏后胚乳活力降低的问题。且处理方法简便易行,45℃处理6个小时即有显著效果,而且无任何危险性及毒副作用。本发明有利于实现该物种在种子库条件下的长期保存,且对于胚乳这一天然三倍体种质资源的长期有效保存和合理利用提供了技术支持。