



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106961878 B

(45) 授权公告日 2021.03.30

(21) 申请号 201710330794.1

(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 106961878 A

(43) 申请公布日 2017.07.21

(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 郭云刚 杨娅娟
蔡杰 杜燕 秦少发 李涟漪
杨湘云

(74) 专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务
所(普通合伙) 53108
代理人 旃习涵

(51) Int. Cl.
A01C 1/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106508183 A, 2017.03.22

CN 103814654 A, 2014.05.28

侯冬花 等. 种子休眠与休眠解除的研究进展.《新疆农业科学》.2007,第44卷(第3期),352.

审查员 曹猛猛

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种提高低温保存后毛桐种子胚活力的方法

(57) 摘要

一种提高低温保存后毛桐种子胚活力的方法,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染色情况,具有活力的胚显示均匀的红色。该方法显著提高了不同产地,低温下储存不同时间的毛桐种子的胚活力。解决了毛桐种子低温保藏后胚活力降低的问题。且处理方法简便易行,无任何危险性及毒副作用。

1. 一种提高低温保存后毛桐种子胚活力的方法,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染色情况,具有活力的胚显示均匀的红色;

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℃。

2. 根据权利要求1所述的一种提高低温保存后毛桐种子胚活力的方法,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染色情况,具有活力的胚显示均匀的红色。

一种提高低温保存后毛桐种子胚活力的方法

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℃)保存后毛桐种子胚活力的方法。

背景技术

[0002] 毛桐(*Mallotus barbatus* (Wall.) Muell. Arg.) 是大戟科 (Euphorbiaceae) 野桐属 (*Mallotus* Lour.) 小乔木树种。分布于亚洲东部和南部各国。国内主要产于云南、四川、贵州、湖南、广东和广西等。生于海拔400-1 300米林缘或灌丛中。

[0003] 茎皮纤维可作制纸原料;木材质地轻软,可制器具;种子油可作工业用油。目前未见毛桐种子萌发及储藏方面研究报道。

[0004] 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的活力会发生变化,从而导致种子活力下降,影响库存质量。因此提高及改善低温冷藏后种子胚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。

[0005] 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毛桐种子几乎不能萌发,对其进行TTC染色后发现,只有少数种子的胚可以染色,几乎全部种子的胚乳均不能染色;结合该属其他类群(如白背叶、白楸及尼泊尔野桐,均另案报道)中的发现本发明判断可能是由于胚及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,用以提高胚的活力。对于该物种低温冷藏后的种子,目前尚无有效方法使其萌发,因此胚活力的评价采用TTC染色法。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于针对现有技术中在低温(-18℃至-20℃)保存一段时间后的毛桐种子胚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毛桐种子胚活力的方法。为实现该物种的长期有效保存及利用提供技术支持。

[0007] 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:

[0008] 一种提高低温保存后毛桐种子胚活力的方法,包括如下步骤:

[0009] (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;

[0010] (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;

[0011] (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;

[0012] (4) 将上述步骤(3)处理后的种子切破种皮及胚乳;

[0013] (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；

[0014] (6) 将上述步骤(5)处理后的种子切开观测胚染色情况,具有活力的胚显示均匀的红色。

[0015] 根据所述的一种提高低温保存后毛桐种子胚活力的方法,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℃。

[0016] 本发明为一种提高低温保存后毛桐种子胚活力的方法,更具体的步骤是:

[0017] 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,以上为国际通用的正常型种子保存方法。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染色情况,具有活力的胚显示均匀的红色。

具体实施方式

[0018] 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。

[0019] 实施例1:

[0020] 1.材料和方法:

[0021] 1.1研究材料:

[0022] 2013年7月,广西防城港市上思县南屏乡常隆村采集成熟的新鲜毛桐(*Mallotus barbatus*)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。

[0023] 1.2研究方法:

[0024] 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 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。2014年11月11日将装有种子的密闭容器放入-18℃至-20℃冷藏。冷藏处理2年1个月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,根据实验需要随机取出相应数量的种子。

[0025] 1.2.2实验设计:将种子分为2组处理,分别为对照组(冷藏后无处理组)和冷藏后热处理组;热处理温度设置为45、60和70℃,时间设置6个小时。每个处理3个重复,每个重复20粒种子。

[0026] 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和70℃。处理6小时后随机取出60粒种子用于检测胚活力。

[0027] 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,观测胚染色情况,具有活力的胚乳显示均匀的红色。

[0028] 1.2.5数据分析:利用SPSS16.0软件对胚染色比例数据进行分析,采用One-WayANOVA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热处理方法对采自广西防城港冷藏后的毛桐种子胚活力的影响:

[0031] 表1 不同温度热处理对冷藏后广西防城港毛桐种子胚染色率(%)的影响

处理	对照	45℃	60℃	70℃
染色率	13.3±6.0a	75.0±2.9b	70.0±10.0b	70.0±5.8b

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

[0034] 由表1可以看出,冷藏后未经处理的种子(对照组)的胚染色率为13.3%,而45、60及70℃热处理后胚的染色率均上升到70%以上,与对照均有显著差异;各个热处理之间无显著差异,说明种子胚对热处理的温度要求不严格;综合能耗和效果,我们认为45℃处理6小时可以达到理想的效果,且能耗也较低。

[0035] 实施例2:

[0036] 1.材料和方法:

[0037] 1.1研究材料:

[0038] 2012年8月13日,重庆市涪陵区蕉石镇采集成熟的新鲜毛桐 (*Mallotus barbatus*) 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。

[0039] 1.2研究方法:

[0040] 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9日将装有种子的密闭容器放入-18℃至-20℃冷藏。冷藏3年5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,根据实验需要随机取出相应数量的种子。

[0041] 1.2.2实验设计:将种子分为2组处理,分别为对照组(冷藏后无处理组)和冷藏后热处理组;热处理温度设置为45、60和70℃,时间设置6个小时。每个处理3个重复,每个重复20粒种子。

[0042] 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和70℃。处理6小时后随机取出60粒种子用于检测胚活力。

[0043] 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,观测胚染色情况,具有活力的胚乳显示均匀的红色。

[0044] 1.2.5数据分析:利用SPSS16.0软件对胚染色比例数据进行分析,采用One-WayANOVA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。

[0045] 2.结果

[0046] 2.1热处理对重庆涪陵冷藏后毛桐种子胚活力的影响。

[0047] 表2 热处理对冷藏后重庆涪陵毛桐种子胚染色率(%)的影响

[0048]	处理	对照	45℃	60℃	70℃
[0049]	染色率	21.7±4.4a	86.7±4.4b	68.3±6.7bc	56.7±6.7c

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

[0051] 由表2可以看出,-20℃下冷藏3年5个月的毛桐种子,未经热处理的种子胚染色率为21.7%;经45℃热处理后,胚染色率提高到86.7%,60℃略有下降但与45℃无显著差异;70℃与45℃相比显著下降,但还是显著高于对照;说明热处理有效提高的-20℃冷藏后的种子胚活力。综合能耗及效果,45℃处理6小时是节能有效的处理方式。

[0052] 3、本发明的积极效果如下:

[0053] 由于目前尚无有效萌发毛桐种子的方法,无法以萌发率进行佐证;但参考该属其他种类(如白背叶、尼泊尔野桐及白楸)的情况,热处理均有效提高了这三种野桐属植物种子胚乳的活力以及种子的萌发率;且胚乳染色的变化规律与该种胚染色的变化规律一致。因此我们认为与现有技术相比,本发明有效提高了了不同产地(广西及重庆),干燥后低温(-18℃至-20℃)下储存不同时间(2年1个月及3年5个月)的毛桐种子胚的活力。较好的解决了毛桐种子低温保藏后胚活力大幅下降的问题,后续可尝试采用活力提高的胚进行离体培养的方法得到新的植株,从而实现该种种质资源在低温储藏后的成功扩繁。