

# 九里香种子超低温保存研究

顾雅坤<sup>1</sup>, 吴 怡<sup>1</sup>, 符 丽<sup>1</sup>, 郑希龙<sup>1</sup>, 曾 琳<sup>1</sup>, 魏建和<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 中国医学科学院北京协和医学院 / 药用植物研究所海南分所 / 海南省南药资源保护与开发重点实验室, 海口 570311;

<sup>2</sup> 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

**摘要:** 研究旨在探索适于九里香 (*Murraya exotica* L.) 种子的液氮超低温保存条件, 为采用液氮超低温保存方法长期保存九里香种子提供依据。以九里香成熟种子为材料, 采用快速干燥法获得不同含水量的种子, 分别用玻璃化法、分步冷冻法和直接冷冻法对其进行液氮超低温保存, 结合石蜡切片法观察种子显微性状, 并测定种子生理生化活性指标。结果发现, 种子含水量由 30% 降至 7%, 其对照组生活力由 98% 缓慢降至 82%; 经不同冷冻方法处理后其生活力随含水量的降低呈先降后升的趋势, 在含水量 7% 时各冷冻组生活力均升至最高, 且此时冻存前后生活力最接近; 分步冷冻处理后的种子生活力普遍高于玻璃化冷冻和直接冷冻处理; 含水量 18%~30% 时种子分步冷冻处理后切面颜色较其他组偏深, 含水量 30% 的种子分步冷冻处理后部分细胞出现空腔或较严重的质壁分离, 含水量 7% 的种子经不同冷冻处理后其活力和结构与对照组相比基本无变化; 分步冷冻处理后种子丙二醛含量、蛋白质含量、过氧化氢酶活性、过氧化物酶活性下降, 脱氢酶活性升高。九里香种子可用液氮超低温保存, 采用含水量为 7% 的种子分步冷冻处理为佳。

**关键词:** 九里香种子; 液氮超低温保存; 含水量; 冷冻方法; 解冻方法

## Study on Cryopreservation of *Murraya exotica* L. Seeds

GU Ya-kun<sup>1</sup>, WU Yi, <sup>1</sup> FU Li<sup>1</sup>, ZHENG Xi-long<sup>1</sup>, ZENG Lin<sup>1</sup>, WEI Jian-he<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College/Hainan Branch Institute of Medicinal Plant Development / Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine, Haikou 570311; <sup>2</sup> Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193)

**Abstract:** This study attempted to explore the suitable liquid nitrogen cryopreservation condition of *Murraya exotica* L. seed and provided a pipeline for the long-term preservation of the seeds. Using mature seeds of *Murraya exotica* L. with different water content using rapid drying method, cryopreservation experiments were carried out with three approaches including vitrification method, step freezing and direct freezing method, followed by an observation of the micro-characters with the method of paraffin section and the quantification of the physiological and biochemical activity indexes. The results showed that the water content of the seed decreased from 30% to 7%, and the viability of the control group slowly decreased from 98% to 82%. After being treated by different freezing methods, the viability first decreased and then rised with the decrease of water content. At 7% water content, the viability of each freezing group reached to the highest, and the viability is the closest before and after cryopreservation at this time. The seed vigor after step freezing was generally higher than that of vitrification and direct freezing. Among them, the seed color at the cutting surface were darker than other groups after step freezing, and the seeds with 30% water content had cavity or severe plasmolysis in some cells after step freezing. The vigor and structure of the seeds in the 7% water content group were basically unchanged after the different freezing treatments compared

收稿日期: 2019-07-01 修回日期: 2019-08-03 网络出版日期: 2019-10-23

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190701003>

第一作者研究方向为药用植物种子学, E-mail: guyakun0920@126.com

通信作者: 曾琳, 研究方向为药用植物种子学, E-mail: zenglin00186@126.com

魏建和, 研究方向为药用植物遗传学及育种学, E-mail: wjianh@263.net

**基金项目:** 国家自然科学基金青年基金项目 ( 81603399 ); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 ( 2016-I2M-2-003 )

**Foundation project:** National Youth Science Foundation of China ( 81603399 ), CAMS Initiative for Innovative Medicine ( 2016-I2M-2-003 )

with the control group. After the step freezing treatment, the malondialdehyde content, protein content, catalase activity and peroxidase activity of the seeds decreased and the dehydrogenase activity was found to be elevated. Thus, we concluded that the *Murraya exotica* L. seeds are able to be stored following the ultralow temperature preservation pipeline in liquid nitrogen, by use of the water content of 7% seed with the method of step freezing.

**Key words:** *Murraya exotica* L. seeds; liquid nitrogen cryopreservation; water content; freezing method; thawing method

九里香 (*Murraya exotica* L.) 为芸香科 (Rutaceae) 九里香属 (*Murraya* J. Koenig) 小乔木, 产自海南、广东等省, 花朵白色且气味芬芳, 可作盆景或街道绿植<sup>[1]</sup>。其药用部位为带叶嫩枝及叶片, 有活血散瘀止痛功效, 可以治疗牙痛、胃痛、跌打肿痛、风湿引起的骨痛等<sup>[2]</sup>。九里香喜生于温暖湿润环境中, 采取种子繁殖方便高效, 一般选取长势良好的母树, 采收饱满完好深红色鲜果留种<sup>[3]</sup>。九里香种子脱水耐性在花后 70 d 最强, 花后 77 d 开始下降, 含水量降至 9% 经短期低温贮藏后发芽率仍可高于 50%<sup>[4]</sup>。

液氮超低温保存技术从开始成功储存植物材料<sup>[5]</sup>发展至今, 已被公认为种质长期保存的最佳方法之一<sup>[6]</sup>。植物种子在液氮超低温环境中会停止细胞新陈代谢, 因而细胞活力和形态理论上可获得稳定保存<sup>[7]</sup>。九里香种子常规方法仅能储藏 5~6 个月<sup>[8]</sup>, 且暂无长期储存方法, 若能利用液氮超低温保存技术实现其种质资源的长期保存, 可大大延长种子寿命, 大幅降低活体种质保存成本。本研究组已成功建立了白木香 (*Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng.)、高良姜 (*Alpinia officinarum* Hance)<sup>[9]</sup>、降香 (*Dalbergia odorifera* T. C. Chen)<sup>[10]</sup>、益智 (*Alpinia oxyphylla* Miq.)<sup>[11]</sup>、决明 (*Cassia tora* L.)<sup>[12]</sup> 等几十种南药种子的超低温保存方法。研究发现九里香种子含水量降至 10% 时仍保持着高发芽率<sup>[4]</sup>, 可进行超低温保存, 但其超低温保存方法尚无报道。在超低温保存过程中, 材料活力和生理生化指标不可避免会受到冷冻处理、解冻等操作影响, 如皱果苋 (*Amaranthus viridis* L.)、罗勒 (*Ocimum basilicum* L.) 种子冻存前后活力变化差别较大<sup>[13]</sup>, 种子冷冻方法和解冻方法分别影响了玉蝉花 (*Iris ensata* Thunb.) 种子<sup>[14]</sup> 和益智种子<sup>[11]</sup> 生理生化指标。本研究以生活力为指标探索适于九里香种子的液氮超低温保存技术, 并利用石蜡切片显微观察<sup>[15-17]</sup> 和生理生化指标测定<sup>[18-20]</sup> 等方法观察液氮超低温保存对其种子结构性状及生理生化指标的影响, 为九里香种子长期稳定保存提供可靠方法。维持生物多样性是人类长久生存的重要

保障, 而种质的长期稳定保存无疑会为其提供更多机会。本研究探索了九里香种子长期保存方法, 为其他蔬菜种质的长期保存提供了经验, 对蔬菜调查与分析工作有所帮助。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为 2017 年 3 月采自海南省海口市秀英区的成熟九里香 (*Murraya exotica* L.) 种子 (初始含水量 30%, 生活力 98%), 由中国医学科学院药用植物研究所海南分所国家南药基因资源库提供, 鉴定人: 郑希龙。将种子装入网袋置于装有蓝色硅胶干燥器中, 室温 25 °C 分别放置 2.5 h、6 h、10 h、15 h、21 h、28 h, 获得含水量分别为  $26\% \pm 1\%$ 、 $22\% \pm 1\%$ 、 $18\% \pm 1\%$ 、 $15\% \pm 1\%$ 、 $11\% \pm 1\%$ 、 $7\% \pm 1\%$  的种子, 种子含水量依据《国际种子检验规程》(ISTA 编) 采用恒温烘干法测定。生活力测定方法为: 取 25 颗种子, 剥开露出种胚浸入 1% TTC 溶液, 3 次重复, 室温 (25~28 °C) 黑暗放置 4 h, 种胚被染为鲜红色种子判定为有生活力种子, 种胚完全不染色、染色较浅或染色面积小于整体 1/2 的种子判定为无生活力种子。

### 1.2 种子冷冻方法

采用直接冷冻法、玻璃化冷冻法、分步冷冻法 3 种方法, 对不同含水量种子进行处理, 以未冷冻种子为对照。(1) 直接冷冻法: 将适量种子装入冻存管直接投入液氮保存;(2) 玻璃化冷冻法: 将装载液 LS (含 2 mol/L 甘油和 0.4 mol/L 蔗糖的 MS 液体培养基) 置入装有种子的冻存管中, 室温放置 25 min 后, 倒出 LS 置入玻璃化保护剂 PVS<sub>2</sub> (含 30% 甘油 + 15% 乙二醇 + 15% 二甲亚砜 + 0.4 mol/L 蔗糖的 MS 液体培养基), 于 4 °C 冰箱中放置 30 min, 随后更换新鲜预冷过的 PVS<sub>2</sub> 试剂, 封紧冻存管迅速投入液氮保存;(3) 分步冷冻法: 将 PVS<sub>2</sub> 试剂置入装有种子的冻存管中, 于 4 °C 冰箱存放 30 min 后立刻移入 -20 °C 冰箱中存放 1 h, 随即投入液氮保存。

### 1.3 种子解冻方法

将液氮中保存 48 h 后的材料取出立刻投入 40 ℃ 温水中解冻 2 min, 其中玻璃化冷冻和分步冷冻组的种子解冻后将冻存管内的 PVS<sub>2</sub> 试剂倒出, 置入洗涤液 DS (含有 1.2 mol/L 蔗糖的 MS 培养液) 清洗 2 次, 每次 10 min, 再换为无菌水清洗 3 次, 每次 10 min, 清洗干净后的种子用滤纸吸干水分, 随直接冷冻组及对照组种子一同用于后续试验。

### 1.4 石蜡切片与观察

将种子切开留取含胚部分, FAA (由福尔马林 5 mL: 冰醋酸 5 mL: 70% 酒精 90 mL 配制而成的固定液) 固定 48 h 以上, 不同浓度乙醇各脱水 3 h, 二甲苯透明, 浸蜡 12 h, 埋蜡, 切片, 展片, 烘干, 脱蜡复水, 番红、固绿双重染色, 脱水处理, 中性树胶封片, 清理干净多余胶体后置玻片盒备用。利用体视显微镜 (尼康 SMZ745) 拍照观察整颗种子外观、切面; 利用生物显微镜 (尼康 ECLPSE80i) 观察染色切片, 注意种胚细胞变化。

### 1.5 生理生化测定方法

用 TTC (氯化三苯基四氮唑) 测定脱氢酶活性<sup>[18]</sup>, 硫代巴比妥酸测定丙二醛 (MDA) 含量<sup>[18]</sup>, 用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 测定过氧化氢酶 (CAT) 活性<sup>[19]</sup>, 愈创木酚测定过氧化物酶 (POD) 活性<sup>[18]</sup>, 用氮蓝四唑测定超氧化

物歧化酶 (SOD) 活性<sup>[18]</sup>, 用试剂盒 (南京建成生物工程研究所淀粉酶试剂盒 C016, 碘-淀粉比色法) 测定  $\alpha$ -淀粉酶活性, 用考马斯亮蓝测定蛋白质含量<sup>[20]</sup>。

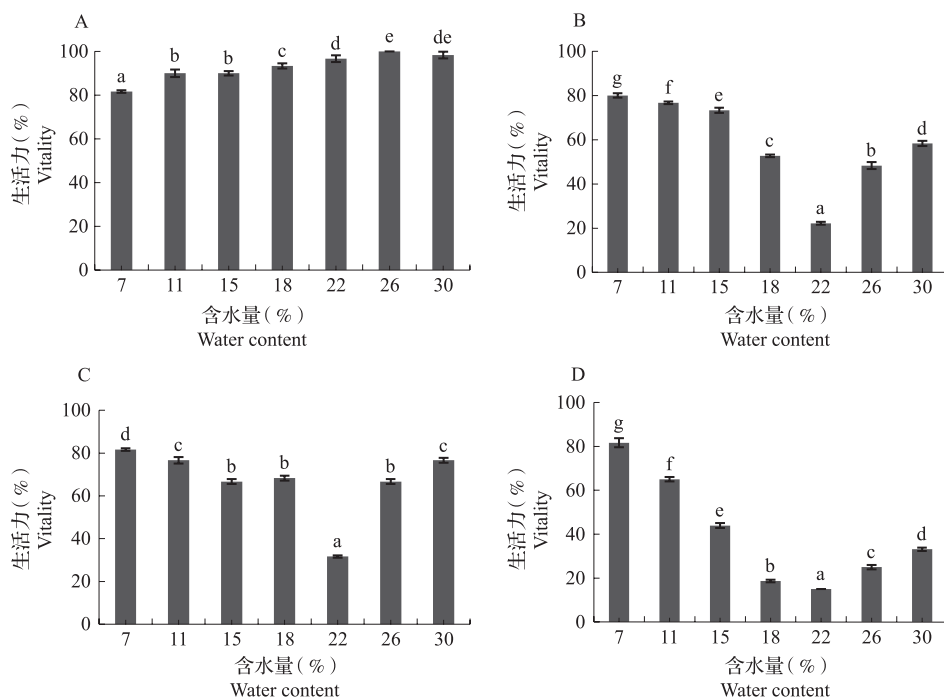
### 1.6 数据分析

本研究均为单因子试验, 每次处理 25 粒种子, 3 次重复。采用 Excel 97-2003 软件进行绘图, SPSS 22.0 软件进行 Duncan 法和 LSD 法分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同冷冻方法对不同含水量九里香种子生活力的影响

未冷冻处理 (对照组) 的九里香种子随含水量的降低, 生活力缓慢下降, 含水量 30% 时种子生活力 98%, 降至 7% 时生活力 82% (图 1A)。各冷冻组种子随含水量的下降, 生活力整体上呈先降后升的趋势, 22% 含水量各冷冻组生活力均降至最低, 7% 含水量各冷冻组生活力均升至最高。含水量为 18%~30% 的分步冷冻组种子生活力明显高于其他冷冻组; 含水量为 11%~15% 的分步冷冻组和玻璃化冷冻组生活力结果相近且高于直接冷冻组。整体上分步冷冻处理结果优于其他冷冻处理, 且含水量 7% 时结果优于其他含水量 (图 1B~D)。综上所述, 九里香种子可采用分步冷冻处理方法保存, 种子含水量 7% 为佳 (图 1)。



A: 对照组; B: 玻璃化冷冻组; C: 分步冷冻组; D: 直接冷冻组。大、小写字母表示差异极显著、显著, 下同

A: Control group, B: Vitrification freezing group, C: Step freezing group, D: Direct freezing group.

Uppercase, lowercase letters indicate a very significant and significant difference, the same as below

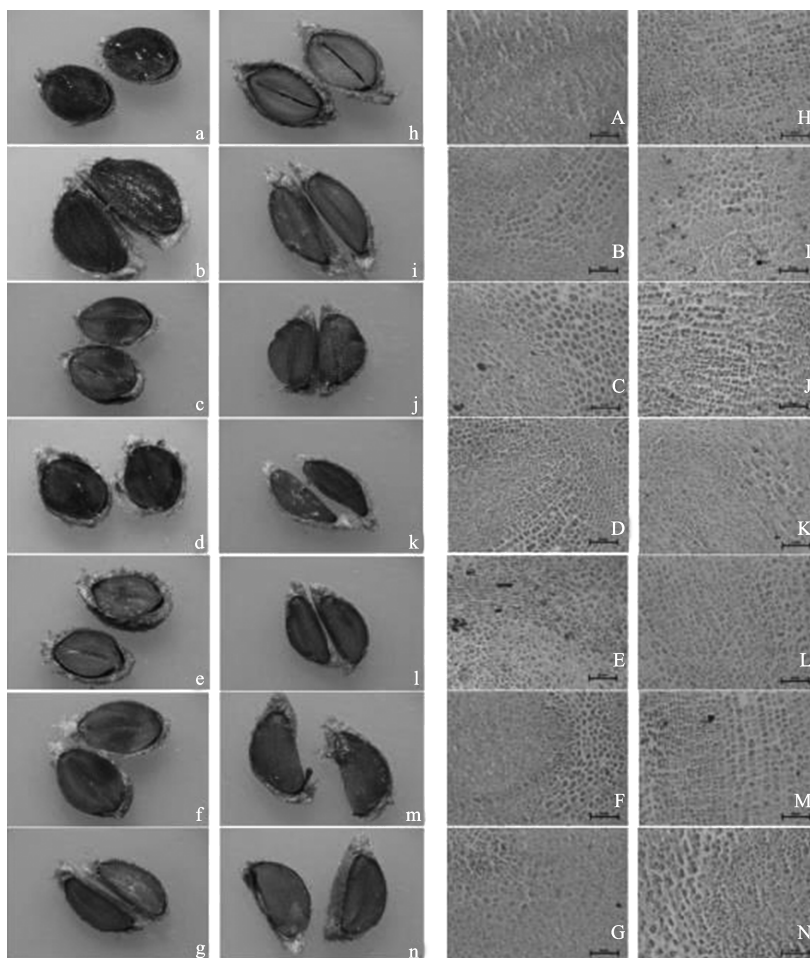
图 1 不同含水量不同冷冻处理方法九里香种子生活力

Fig.1 *Murraya exotica* L. seed viability under different water content and cryopreservation methods

## 2.2 不同冷冻方法对不同含水量九里香种子组织结构的影响

含水量 18%~30% 时种子切面较其他组颜色偏深(图 2 a~n); 含水量 30% 时分步冷冻组种子部分细胞出现空腔或较严重的质壁分离, 其他各组多数

细胞结构完整。分步冷冻处理对含水量 7%~15% 的九里香种子组织结构几乎不产生影响(图 2A~N)。含水量 7% 的各冷冻组和对照组种子切面及细胞结构无明显差别。不同冷冻处理方法对含水量 7% 的九里香种子组织结构几乎无影响(图 3)。



a~g 分别为分步冷冻组含水量 30%、26%、22%、18%、15%、11%、7% 种子切面图, h~n 分别为对照组含水量 30%、26%、22%、18%、15%、11%、7% 种子切面图; A~G 分别为分步冷冻组含水量 30%、26%、22%、18%、15%、11%、7% 种子显微性状图,

H~N 分别为对照组含水量 30%、26%、22%、18%、15%、11%、7% 种子显微性状图

a-g are the seed sections of step freezing group in the water content of 30%, 26%, 22%, 18%, 15%, 11%, 7%, h-n are the seed sections of control group in the water content of 30%, 26%, 22%, 18%, 15%, 11%, 7%, A-G are the seed micrographs of step freezing group in the water content of 30%, 26%, 22%, 18%, 15%, 11%, 7%, H-N are the seed micrographs of control group in the water content of 30%, 26%, 22%, 18%, 15%, 11%, 7%

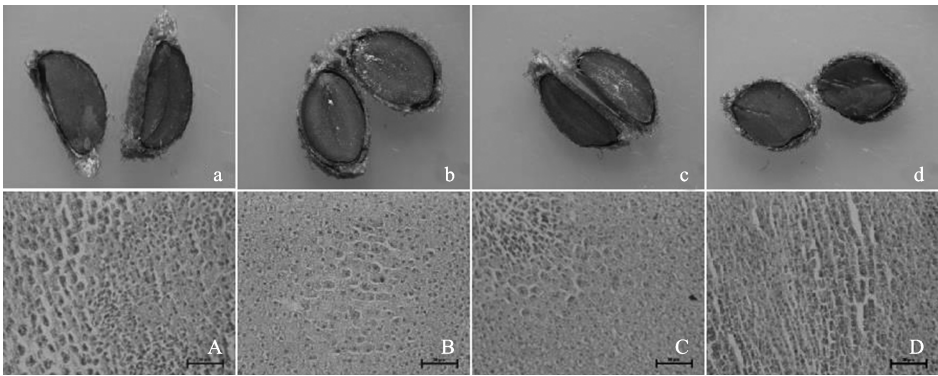
图 2 九里香不同含水量种子、对照的分步冷冻组切面与显微性状图

Fig.2 Seed cut surface and microscopical diagram of different water contents in the control group and step freezing group of *Murraya exotica* L.

## 2.3 分步冷冻处理对含水量 11% 和 7% 的九里香种子生理生化指标的影响

分步冷冻处理后九里香种子丙二醛含量、过氧化氢酶活性、过氧化物酶活性、蛋白质含量下降, 脱氢酶活性升高。另外对照组含水量 7% 和含水量 11% 相比, 九里香种子超氧化物歧化酶活性、丙二

醛含量、蛋白质含量高, 过氧化氢酶活性、 $\alpha$ -淀粉酶活性、过氧化物酶活性、脱氢酶活性低; 分步冷冻组含水量 7% 和含水量 11% 相比, 超氧化物歧化酶活性、 $\alpha$ -淀粉酶活性、过氧化氢酶活性、蛋白质含量高, 过氧化物酶活性、丙二醛含量低, 脱氢酶活性差别不大(表 1)。



a~d 分别为含水量 7% 时对照组、玻璃化冷冻组、分步冷冻组、直接冷冻组种子切面图；A~D 分别为含水量 7% 时对照组、玻璃化冷冻组、分步冷冻组、直接冷冻组种子显微性状图

a-d are the seed sections of control group, vitrification freezing group, step freezing group, direct freezing group in the water content of 7%, A-D are the seed micrographs of control group, vitrification freezing group, step freezing group, direct freezing group in the water content of 7%

图 3 九里香种子 7% 含水量不同冷冻方法种子切面及显微性状图

Fig.3 Seed cut surface and microscopical diagram of different freezing methods of *Murraya exotica* L.

表 1 分步冷冻处理对九里香种子生理生化的影响(  $\bar{x} \pm s$ , n=3 )

Table 1 Effect of step freezing method on physiological and biochemical characteristics of *Murraya exotica* L. seeds(  $\bar{x} \pm s$ , n=3 )

| 含水量( % )<br>Water content | 处理<br>Treatment | 脱氢酶活性<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 丙二醛含量<br>( $\mu\text{mol/mg}$ ) | 过氧化氢酶<br>活性<br>( $\text{U/mg}$ ) | 过氧化物酶活<br>性( $\text{U/g}$ ) | 超氧化物歧<br>化酶活性            |                                     |                |
|---------------------------|-----------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------------------|----------------|
|                           |                 | Dehydrogenase<br>activity     | Malondialdehyde<br>content      | Catalase<br>activity             | Peroxidase<br>activity      | 化酶活性<br>( $\text{U/g}$ ) | $\alpha$ -淀粉酶<br>活性( $\text{U/g}$ ) | 蛋白质含<br>量( % ) |
| 11                        | 对照组             | 9.3 $\pm$ 0.1b                | 670 $\pm$ 20.8a                 | 8.5 $\pm$ 0.2b                   | 59217.4 $\pm$ 94.4b         | 370.9 $\pm$ 0.9a         | 40.9 $\pm$ 1.8b                     | 2.3 $\pm$ 0.2a |
|                           | 分步<br>冷冻组       | 10.1 $\pm$ 0.3A               | 470 $\pm$ 20.8B                 | 4.6 $\pm$ 0.2A                   | 40324.4 $\pm$ 68.6B         | 370.1 $\pm$ 4.1A         | 26.3 $\pm$ 0.3A                     | 2.0 $\pm$ 0.1A |
| 7                         | 对照组             | 8.6 $\pm$ 0.0a                | 700 $\pm$ 11.6b                 | 8.0 $\pm$ 0.2a                   | 46100.1 $\pm$ 32.4a         | 381.8 $\pm$ 4.6b         | 30.8 $\pm$ 0.4a                     | 3.7 $\pm$ 0.2b |
|                           | 分步<br>冷冻组       | 10.2 $\pm$ 0.2A               | 380 $\pm$ 10.0A                 | 5.2 $\pm$ 0.2B                   | 38681.9 $\pm$ 52.0A         | 402.3 $\pm$ 1.1B         | 37.9 $\pm$ 0.5B                     | 2.9 $\pm$ 0.1B |

3 讨论

虽然九里香种子含水量低至 7% 时仍保持着 82% 的高活力,但其不耐储藏,常规方法保存 4 个月左右后基本无活力<sup>[21]</sup>,需探索适宜的长期保存方法。本研究得到适于九里香种子的液氮超低温保存方法,可用于其种质资源的长期保存。

不同的冷冻处理方法对种子活力影响不同。分步冷冻法能使细胞内水分有充足时间流到细胞外结冰而减小冷冻伤害<sup>[22]</sup>,所以含水量 18%~30% 分步冷冻组种子生活力明显高于其他冷冻组;玻璃化冷冻法虽然能直接使材料进入玻璃态,但玻璃化保护剂会对种子产生毒害作用从而影响活力<sup>[23]</sup>,所以含水量在 18%~30% 时,虽然玻璃化冷冻组生活力优于直接冷冻组却仍偏低;而直接冷冻法温度下

降迅速,高含水量种子易受损伤,适于低含水量种子<sup>[22]</sup>,所以在较高含水量时,直接冷冻组生活力最低,反而随着含水量由 18% 降至 7%,种子生活力有大幅度回升。整体上随着九里香种子含水量的下降,各冷冻组生活力呈先下降后上升的趋势,转折点即生活力最低点为含水量 22%,原因可能是含水量为 22%~30% 时,含水量降低对冷冻后种子活力产生的影响大于冷冻处理方法的影响,含水量为 7%~22% 时,冷冻处理方法对种子活力产生的影响大于含水量的影响。

含水量及冷冻处理不仅影响九里香种子活力,也影响其生理生化活性。如玉蝉花种子可溶性蛋白质量分数随其含水量的降低而呈现先升后降的趋势,过氧化物酶活性也有不同<sup>[14]</sup>,本试验中九里香种子含水量从 11% 降至 7%,对照组脱氢酶活性、过

氧化氢酶活性、过氧化物酶活性、 $\alpha$ -淀粉酶活性降低,丙二醛含量、超氧化物歧化酶活性、蛋白质含量升高。脱氢酶、过氧化氢酶和过氧化物酶是重要的抗逆酶<sup>[23]</sup>, $\alpha$ -淀粉酶有助于种子萌发<sup>[24]</sup>,九里香种子含水量较高时这几种酶活性也较高;植物受外界胁迫时MDA含量会增高<sup>[25]</sup>,九里香种子含水量较低时,丙二醛含量较高。说明种子含水量越高活力越高,与生活力检测结果一致。超低温冷冻对益智种子可溶性糖和丙二醛含量影响不大,对超氧化物歧化酶、过氧化物酶等含量有一定影响<sup>[11]</sup>。本试验中九里香种子含水量为11%和7%时,分步冷冻组较对照组各项生理生化指标均有变化,且变化趋势基本一致。冻存后过氧化氢酶和过氧化物酶降低说明种子受冷冻影响活力降低,丙二醛含量降低说明冷冻没有使种子受到明显胁迫,即分步冷冻处理方法对种子伤害不大,脱氢酶活性升高可能是由于分步冷冻处理方法促进了种子某些生理活动。

本研究表明九里香种子液氮超低温保存是可行的,并且本课题组成功建立了高良姜<sup>[9]</sup>、降香<sup>[10]</sup>等几十种植物种子的液氮超低温保存方法,也有学者对樟树种子<sup>[26]</sup>、合欢种子<sup>[27]</sup>、香蕉离体茎尖<sup>[28]</sup>、桃花粉<sup>[29]</sup>等种质进行过超低温保存研究,探索出合适的超低温保存方法。通过对比不同种质最适超低温保存条件,可见液氮超低温保存对不同基因型种源有一定的适用性,关键在于探索不同种子适于液氮超低温保存的含水量及具体冷冻处理及解冻方法。

#### 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 1997版. 北京: 科学出版社, 2004: 143  
Chinese Flora Editorial Board of the Chinese Academy of Sciences. Flora of China: 1997 edn. Beijing: Science Press, 2004: 143
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 10  
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of China: 2015 edn. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015: 10
- [3] 何开家, 曹斌, 姜平川, 韦桂宁, 梁江昌, 周军. 九里香 (GAP) 规范化种植技术. 大众科技, 2009 (3): 123-124  
He K J, Cao B, Jiang P C, Wei G N, Liang J C, Zhou J. *Murraya exotica* L. (GAP) standardized planting technology. Popular Science & Technology, 2009 (3): 123-124
- [4] 杨期和, 殷寿华, 夏永梅, 兰芹英. 九里香种子脱水耐性和萌发生理的研究. 广西植物, 2002, 22 (6): 537-542  
Yang Q H, Yin S H, Xia Y M, Lan Q Y. Study on desiccation-tolerance and germination physiology of *Murraya paniculata* seeds. Guihaia, 2002, 22 (6): 537-542
- [5] Nag K K, Street H E. Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. Nature, 1973, 245: 270-272
- [6] 陈晓玲, 张金梅, 辛霞, 黄斌, 卢新雄. 植物种质资源超低温保存现状及其研究进展. 植物遗传资源学报, 2013, 14 (3): 414-427  
Chen X L, Zhang J M, Xin X, Huang B, Lu X X. Progress in cryopreservation state and research of plant germplasm resources. Journal of Plant Genetic Resources, 2013, 14 (3): 414-427
- [7] Basu C. Gene amplification from Cryopreserved *Arabidopsis thaliana* shoot tips. Current Issues in Molecular Biology, 2008, 10 (1/2): 55-59
- [8] 程必强, 马信祥. 五十种热带植物种子的贮藏与寿命. 种子, 1987 (3): 35-38  
Cheng B Q, Ma X X. Storage and lifespan of 50 tropical plant seeds. Seed, 1987 (3): 35-38
- [9] 曾琳, 何明军, 陈葵, 郑希龙. 高良姜种子超低温保存研究. 中国农学通报, 2014, 30 (28): 164-168  
Zeng L, He M J, Chen K, Zheng X L. Study on cryopreservation of *Alpinia officinarum* Hance seeds. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30 (28): 164-168
- [10] 曾琳, 何明军, 陈葵, 魏建和. 降香黄檀种子和离体胚超低温保存研究. 中国中药杂志, 2014, 39 (12): 2263-2266  
Zeng L, He M J, Chen K, Wei J H. Cryopreservation study on seeds and embryos in *Dalbergia odorifera*. China Journal of Chinese Materia Medica, 2014, 39 (12): 2263-2266
- [11] 曾琳, 吴怡, 何明军, 顾雅坤, 王德立. 超低温冷冻对益智种子生理生化特性的影响. 广西植物, 2018, 38 (4): 529-535  
Zeng L, Wu Y, He M J, Gu Y K, Wang D L. Physiological and biochemical characteristics of *Alpinia oxyphylla* seeds after cryopreservation. Guihaia, 2018, 38 (4): 529-535
- [12] 曾琳, 何明军, 顾雅坤, 吴怡, 郑希龙. 五种豆科药用植物种子超低温保存技术研究. 生物资源, 2017, 39 (1): 42-47  
Zeng L, He M J, Gu Y K, Wu Y, Zheng X L. Study on cryopreservation of five kind of medicinal legume seeds. Biotic Resources, 2017, 39 (1): 42-47
- [13] 曾琳, 何明军, 吴怡, 顾雅坤, 李榕涛. 6种草本药用植物种子超低温保存技术研究. 热带作物学报, 2017, 38 (6): 1149-1154  
Zeng L, He M J, Wu Y, Gu Y K, Li R T. Cryopreservation of 6 kind of medicinal herbs seeds. Chinese Journal of Tropical Crops, 2017, 38 (6): 1149-1154
- [14] 宋红, 曹柏, 王玲. 超低温保存对玉蝉花种子生理生化特性的影响. 东北林业大学学报, 2016, 44 (4): 44-47  
Song H, Cao B, Wang L. Physiological and biochemical characteristics of *iris ensata* seeds after cryopreservation. Journal of Northeast Forestry University, 2016, 44 (4): 44-47
- [15] 赵俊, 木万福, 张志星. 植物石蜡切片技术改进. 安徽农学通报, 2009, 15 (5): 69, 90  
Zhao J, Mu W F, Zhang Z X. Improvement of plant paraffin section technical. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2009, 15 (5): 69, 90
- [16] 毛晓霞. 石蜡切片制作方法的改良. 安徽农学通报, 2013, 19 (8): 15-16, 39  
Mao X X. The improved methods of paraffin sections production. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2013, 19 (8): 15-16, 39
- [17] 韦颖. 105种常用药用植物果实、种子性状与显微鉴别特征研究. 北京: 中国中医科学院, 2012  
Wei Y. The study on fruits and seeds from 105 kinds of medicinal

- plants for identification by description and microscopic identification. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2012
- [18] 刘子凡. 种子学实验指南: 1 版. 北京: 化学工业出版社, 2010: 62-105
- Liu Z F. Seed science experiment guide: 1st edn. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 62-105
- [19] 尹燕桦, 董学会. 种子学实验技术: 1 版. 北京: 中国农业出版社, 2008: 23-67
- Yin Y P, Dong X H. Seed science experiment technique: 1st edn. Beijing: China Agriculture Press, 2008: 23-67
- [20] 鱼小军. 草类植物种子实验技术: 1 版. 北京: 化学工业出版社, 2013: 132-144
- Yu X J. Grass plant seed experiment technique: 1st edn. Beijing: Chemical Industry Press, 2013: 132-144
- [21] 陈瑛. 实用中药种子技术手册: 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 296-297
- Chen Y. Practical Chinese medicine seed technical manual: 1st edn. Beijing: People's Medical Publishing House, 1999: 296-297
- [22] 程志英. 菊花 (*Dendranthema morifolium*) 茎尖超低温处理过程中的相关生理生化与结构变化. 南京: 南京农业大学, 2006
- Cheng Z Y. Physiological and biochemical and structure characteristics of chrysanthemum shoot tips during cryopreservation. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2006
- [23] 钱红格. 三种榆属树种种子萌发特性及活力变化的研究. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009
- Qian H G. Study on seed germination characteristic and seed vigor changes of three elm species. Yang Ling: Northwest A&F University, 2009
- [24] 赵玉锦, 王台. 水稻种子萌发过程中  $\alpha$ -淀粉酶与萌发速率关系的分析. 植物学通报, 2001, 18(2): 226-230
- Zhao Y J, Wang T. Analysis of the relationship between  $\alpha$ -amylase and germination rate of rice seeds during the process of seed germination. Chinese Bulletin of Botany, 2001, 18(2): 226-230
- [25] 宋萍萍. 怀菊花种质资源玻璃化超低温保存技术研究. 新乡: 河南师范大学, 2010
- Song P P. The Studies on cryopreservation of Huaiqing Chrysanthemum (*Dendranthema morifolium*) germplasm by vitrification. Xinxiang: Henan Normal University, 2010
- [26] 马健, 叶润燕, 张俊红. 樟树成熟种子超低温保存研究. 安徽农业科学, 2019, 47(9): 170-172
- Ma J, Ye R Y, Zhang J H. Study on cryopreservation of *Cinnamomum camphora* presl mature seeds. Anhui Agricultural Science, 2019, 47(9): 170-172
- [27] 河英虎, 傅伊倩, 刘燕. 合欢和青杆种子超低温保存研究. 种子, 2013, 32(3): 33-35, 40
- He Y H, Fu Y Q, Liu Y. Cryopreservation seeds of *Albizia julibrissin* and *Picea wilsonii*. Seed, 2013, 32(3): 33-35, 40
- [28] 李俊慧, 何平, 陈晓玲, 卢新雄, 辛霞, 张志娥, 辛萍萍. 香蕉离体茎尖超低温保存研究. 植物遗传资源学报, 2010, 11(1): 34-39
- Li J H, He P, Chen X L, Lu X X, Xin X, Zhang Z E, Xin P P. Cryopreservation of in vitro shoot-tips of banana (*Musa* spp.). Journal of Plant Genetic Resources, 2010, 11(1): 34-39
- [29] 张金梅, 闫文君, 李雪, 黄斌, 张海晶, 赵剑波, 姜全, 陈晓玲. 桃花粉低温和超低温保存方法比较研究. 植物遗传资源学报, 2017, 18(4): 670-675
- Zhang J M, Yan W J, Li X, Huang B, Zhang H J, Zhao J B, Jiang Q, Chen X L. Study on low temperature storage and cryopreservation of pollen for peach germplasm resources. Journal of Plant Genetic Resources, 2017, 18(4): 670-675