

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201704031

引文格式: 曾琳, 吴怡, 何明军, 等. 超低温冷冻对益智种子生理生化特性的影响 [J]. 广西植物, 2018, 38(4):529-535

ZENG L, WU Y, HE MJ, et al. Physiological and biochemical characteristics of *Alpinia oxyphylla* seeds after cryopreservation [J]. *Guihaia*, 2018, 38(4):529-535

超低温冷冻对益智种子生理生化特性的影响

曾琳, 吴怡, 何明军, 顾雅坤, 王德立*

(中国医学科学院药用植物研究所海南分所, 海口 570311)

摘要: 益智 (*Alpinia oxyphylla*) 是我国四大南药之一, 其种子为顽拗性种子, 不耐干燥和低温, 无法常规保存。为解决益智种子长期稳定保存的问题, 该研究以益智种子为材料, 从种子含水量以及冷冻方式方面优化益智种子超低温保存方法, 并对比液氮冷冻前后种子发芽率、 α -淀粉酶活性、超氧化物歧化酶活性、过氧化物酶活性、脱氢酶活性、丙二醛含量等活力指标, 分析液氮超低温冷冻对益智种子生理生化特性的影响。结果表明: 直接液氮冷冻含水量 13.92%~14.38% 范围的种子是益智种子超低温保存的最佳条件。液氮冷冻后, 随着超低温冷冻时间的延长, 益智种子发芽率先由 76.76% 下降至 52.5%, 再上升至 65%, 最后下降并稳定在 50% 以上。其种子 α -淀粉酶活性先下降后上升, 然后又下降, 最后上升并稳定至冷冻前的水平。丙二醛含量则是先上升后下降, 最后趋于平稳状态。过氧化物酶活性是先下降, 然后稳定在恒定水平。超氧化物歧化酶活性是随着冷冻时间的延长而持续上升, 脱氢酶活性则是持续下降。以上结果说明, 液氮冷冻时间对益智活力有一定的影响, 但对种子有些性能具有一定的促进作用。无论是发芽率, 还是生理生化指标, 都不同程度表明液氮超低温保存益智种子是可行的。

关键词: 超低温保存, 益智种子, 含水量, 生理生化特性, 种子发芽率

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)04-0529-07

Physiological and biochemical characteristics of *Alpinia oxyphylla* seeds after cryopreservation

ZENG Lin, WU Yi, HE Mingjun, GU Yakun, WANG Deli*

(Hainan Branch Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Haikou 570311, China)

Abstract: *Alpinia oxyphylla* was one of the four famous south medicines in China. Its seeds were the recalcitrant seeds, which could not be preserved in dried and frozen environment, therefore, the seeds of *Alpinia oxyphylla* could not be reserved by regular way, in low temperature and low humidity conservation. In order to solve the *A. oxyphylla* seeds with long-term and stability storage, we focused on seed moisture content and freezing manner, cryopreservation method opti-

收稿日期: 2017-05-19

基金项目: 海南省中药现代化项目(2015ZY03); 中央高校基本科研业务费专项(协和青年基金)(3332016071); 海南省重点研发计划项目(ZDYF2016145) [Supported by the Program of Chinese Medicine Modernization in Hainan (2015ZY03); Fundamental Research Fund for the Central Universities (PUMC Youth Fund) (3332016071); Key R & D Program in Hainan (ZDYF2016145)]。

作者简介: 曾琳(1986-), 女, 湖南衡阳人, 硕士研究生, 助理研究员, 研究方向为药用植物种子学, (E-mail) zenglin00186@126.com。

*通信作者: 王德立, 硕士, 副研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为南药栽培学, (E-mail) wdl101@sina.com。

mization, seed vigor indexes under liquid nitrogen, and the effects of cryopreservation on the physiological and biochemical characteristics. The seed vigor indexes, including germination, activity of α -amylase, SOD, POD, dehydrogenase, MDA. The results showed that the *A. oxyphylla* seeds with water content of 13.92%–14.38% cryopreserved by rapid freezing could obtain the optimum effect. After liquid nitrogen freezing, the germination rate of the seeds decreased significantly, but with the extension of the freezing time, the germination rate was more than 50%. There was no significant effect on the activity of α -amylase and the content of MDA in liquid nitrogen, a decrease in the dehydrogenase and POD activity of seeds after freezing, and the activity of SOD increased with the adding of freezing time. Above results indicate that freezing time have a certain influence on seeds vigor of *A. oxyphylla*, but it can promote some performance of seeds. Both in germination rate, and physiological and biochemical indexes, show that *A. oxyphylla* seeds preserved with liquid nitrogen is feasible.

Key words: cryopreservation, seeds of *Alpinia oxyphylla*, water content, physiological and biochemical characteristics, seed germination rate

益智 (*Alpinia oxyphylla*) 为我国四大南药之一, 隶属姜科山姜属植物, 多年生草本, 以成熟果实入药, 具有温脾止泻摄涎, 暖肾缩尿固精之功效, 是我国常用药材 (黄国琦, 2013)。益智以种子繁殖, 其种子寿命较短, 含水量降至 10% 以下很快丧失活力, 室温或 4 °C 冰箱贮藏 6 个月后, 其种子活力均降至 45% 以下 (曾琳等, 2015), 不宜用常规的低温低湿法贮藏。根据益智种子不耐干燥和低温的贮藏行为, 可将益智种子归属为顽拗性种子 (Roberts, 1973)。

与传统的就地保存和迁地保存法相比, 超低温保存法是长期、稳定、有效贮藏顽拗性药用植物种子的最合适的方法 (Roberts, 1975), 在液氮 (-196 °C) 超低温环境下, 植物种子所有细胞分裂和代谢活动都几乎停止、处于相对稳定的生物学状态 (王晗等, 2015)。液氮超低温保存除了对种子活力和萌发有影响外, 还对生理生化指标有影响 (Byron et al, 2013)。Cejas et al (2013) 在菜豆种子超低温贮藏恢复实验中发现, 经超低温冷冻后的菜豆种子苗酚类物质和醛含量增加了, 蛋白含量减少了。

研究还发现, 超低温冷冻后的玉蝉花种子可溶性蛋白含量、过氧化物酶 (POD) 活性和菊花茎尖超氧化物歧化酶 (SOD) 活性降低了 (宋红等, 2016; 程志英, 2006), 而超低温冷冻后的菊花茎尖可溶性糖含量、POD 活性和花烛胚性细胞可溶性蛋白含量、可溶性糖含量、SOD、POD 活性以及大

苞鞘石斛原球茎可溶性蛋白含量、丙二醛 (MDA) 含量都增加了 (程志英, 2006; 王更亮, 2011; 刘晓东等, 2013)。所以在对植物种子进行超低温长期储藏前, 应该对这些指标进行检测。曾琳等 (2015) 已对益智种子进行了液氮超低温保存实验探究, 并已证明液氮超低温保存益智种子是可行的。但是, 对益智种子超低温保存后生理生化指标是否发生变化、变化规律均不明了。

本研究对益智种子超低温保存方法进行优化, 并测定冷冻前后种子发芽率、 α -淀粉酶活性、脱氢酶活性、超氧化物歧化酶活性、过氧化氢酶活性、过氧化物酶活性和丙二醛含量的变化情况, 以期探讨超低温冷冻对益智种子生理生化特性的影响, 为益智种质资源保护提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

成熟的益智种子采自于海南省五指山水满乡水满新村, 由国家南药基因资源库提供, 其初始含水量为 18.64%, 初始发芽率为 85%, 密封保存于 4 °C 冰箱中备用。

1.2 种子水分测定方法

将种子放于盛有硅胶的干燥器中, 根据初始含水量和预测干燥速度 (河英虎等, 2013), 分别干燥 0、6、10、14、20、24、32 h, 获得含水量为 18.64%、16.39%、14.38%、13.92%、12.29%、11.55% 和

10.36%的实验种子。根据国家农作物种子检验规程第六章(GB/T 3543.6)水分测定法,选用低温 $[(103\pm 2)^\circ\text{C}]$ 烘干法,烘 16 h 后,测定种子的含水量。

1.3 种子超低温冷冻

经过干燥的种子,分为四组,一组为对照组,直接发芽或生理生化实验;另三组用于液氮冷冻。本实验采用缓慢冷冻法、快速冷冻法和玻璃化冷冻法对益智种子进行超低温保存实验,以期获得益智种子超低温冷冻最适条件。(1)缓慢冷冻组:将种子放入加有冷冻保护剂 PVS₂(室温)的冻存管中,置于 4 °C 冰箱中 0.5 h,取出立即放入-20 °C 冰柜中 1 h,1 h 后迅速投入液氮罐内。(2)直接冷冻组:将放有种子的冻存管直接投入液氮冷冻。(3)玻璃化冷冻组:将种子放入加有装载液 LS 的冻存管中,室温处理 20 min 后,倾倒装载液,加入冷冻保护剂 PVS₂并置于冰上 30 min,而后更换成新鲜的预冷过的 PVS₂(0 °C),并迅速投入至液氮罐中保存。冷冻保护剂(PVS₂)为 30%甘油+15%乙二醇+15%二甲亚砜+0.4 mol·L⁻¹蔗糖;装载液(LS)为 2 mol·L⁻¹甘油+0.4 mol·L⁻¹蔗糖的 MS 液体液。

1.4 解冻和发芽

24 h 后取出液氮冻存的种子,40 °C 水浴解冻 5 min,后将玻璃化冷冻和缓慢冷冻处理的种子用洗涤液 US 洗涤 3 次,每次 5 min,再用无菌水洗涤 2 次,每次 10 min。将洗涤后的种子用滤纸吸干表面水分后,转移至发芽盒培养,置于人工气候培养箱中(25~30 °C),保持发芽盒内滤纸表面湿润,每天检查并记录种子的萌发情况。

1.5 种子生理生化指标测定

分别取冷冻 0 h、1 d、7 d、30 d、60 d、90 d、180 d、365 d 的对照组和最佳冷冻组的种子各 50 颗,回湿吸胀处理 24 h,测定以下指标。 α -淀粉酶活性测定采用 3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS 法)(王丽娜等,2009);脱氢酶活性和超氧化物歧化酶(SOD)活性采用氮蓝四唑法(NBT 法)(李合生,2000);过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚法(张淑珍等,2012);丙二醛(MDA)含量采用硫代巴比妥酸法(张慧茹,1999)测定。

1.6 数据分析

统计益智种子发芽数,按公式计算发芽率;发芽率=种子发芽数/实验种子数 $\times 100\%$ 。使用 SAS 9.3 软件对酶活性及发芽率等数据进行方差分析和多重比较,利用 EXCEL(2016)软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 超低温冷冻对种子发芽率的影响

由表 1 可知,未经液氮冷冻的益智种子发芽率随着含水量的下降而降低,超低温冷冻后益智种子发芽率随含水量的下降而呈先上升后下降趋势。同一含水量时,冷冻前的种子发芽率显著高于冷冻后的种子发芽率。这表明益智种子不耐脱水和低温,按种子贮藏特性划分,益智种子为顽拗性种子。

不同含水量的种子,直接冷冻组的发芽率均显著高于缓慢冷冻组和玻璃化冷冻组。含水量在 13.92%~14.38%时,三个冷冻组的种子发芽率都高于其他含水量,且直接冷冻组的种子发芽率均在 52%以上。由此表明,含水量 13.92%~14.38%是益智种子超低温保存的最适含水量范围,直接冷冻法是益智种子超低温保存的最适冷冻方式。

2.2 超低温冷冻时间对种子发芽率的影响

从理论上讲,植物的种子一旦成功冷冻到-196 °C,种子在液氮中的保存期就可能无限延长(Sakai et al,1990)。图 1 和表 2 显示,液氮分别冷冻 0 h、1 d、7 d、30 d、60 d、90 d、180 d、365 d 后的益智种子发芽率,随着超低温冷冻时间延长,呈先下降后上升再下降最后趋于平稳态势。冷冻 7 d 的益智种子发芽率较冷冻前急剧下降,冷冻 7 d 之后种子发芽率呈缓慢上升趋势,冷冻 90 d 后又开始下降,180 d 后发芽率趋于平稳。益智种子发芽率在超低温冷冻过程中虽有上升下降,但总体看发芽率均在 50%以上。

2.3 超低温保存对种子生理生化特性的影响

如图 2 和表 2 所示,随着超低温保存时间的延长,益智种子 α -淀粉酶活性呈下降、上升又下降、上升趋势,最后与冷冻前无差异;益智种子丙二醛含量呈先上升后下降最后趋于平稳状态,这表明超

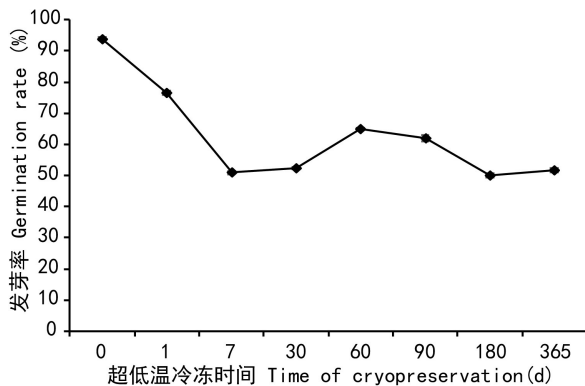
表 1 不同冷冻方式益智种子发芽率的比较

Table 1 Comparison of *A. oxyphylla* seed germination rates treated with different freezing methods

含水量 Water content (%)	种子发芽率 Seed germination rate (%)			
	对照组 Control group	缓慢冷冻组 Slow freezing group	直接冷冻组 Direct freezing group	玻璃化冷冻组 Vitrification freezing group
18.64	85±1.03a1	21.67±0.31d3	36.11±0.32e2	17.33±0.22e4
16.39	81.33±0.42b1	33.33±0.21c4	47.78±0.26d2	37.67±0.31b3
14.38	76.76±0.33c1	43.44±0.27a4	63.33±0.36a2	46.67±0.25a3
13.92	63.5±0.40d1	34.33±0.28b3	52.5±0.55b2	31.33±0.32c4
12.29	62.29±0.28e1	20±1.08e3	43.33±0.37c2	15.56±0.21f4
11.55	54.44±0.37f1	11.11±0.14f3	30±0.29g2	10±0.61g4
10.36	50.34±0.15g1	10±0.29g4	31.11±0.31f2	22.22±0.46d3

注: 同一列不同小写字母表示不同含水量同一处理下种子发芽率差异极显著 ($P > F < 0.0001$); 同一行不同数字表示同一含水量不同处理下种子发芽率差异极显著 ($P > F < 0.0001$)。

Notes: Different lower letters in the same column indicate that seed germination rates with the same treatment and different water contents are significantly different ($P > F < 0.0001$); Different numbers in the same line indicate seed germination rates with the same water content and different treatments are significantly different ($P > F < 0.0001$).



注: 误差线表示 1.96 倍的标准差。下同。

Note: Error line indicates 1.96 times of the standard deviation. The same below.

图 1 超低温冷冻时间对益智种子发芽率的影响
Fig. 1 Effects of freezing time in cryopreservation on seed germination rates of *A. oxyphylla*

低温保存对益智种子可溶性糖和 MDA 含量影响不大。益智种子 SOD 活性随超低温保存时间的延长而显著上升, 这表明在液氮冷冻刺激下, 种子清除自由基的能力增强了, 从而抵制活性氧水平的升高, 对抗氧自由基对种子活力造成的损伤。随着超低温保存时间的延长, 益智种子 POD 活性呈

先下降后趋于平稳态势, 这说明超低温冷冻使种子受损, 其种子活性氧水平升高, 从而使其抗氧化能力减弱, 活性下降; 90 d 后趋于平稳, 有可能是经过液氮冷冻 90 d, 种子内部过氧化物酶活性到了临界点。种子脱氢酶活性随着超低温冷冻时间的延长而显著下降, 液氮冷冻使得种子催化氧化还原的酶活性降低了。

3 讨论与结论

超低温保存技术就是将植物种质在液氮温度下冷冻, 使细胞保持在完全不活动的状态。从理论上讲, 若能建立良好的超低温保存体系, 使植物种质经液氮冷冻后仍有多数细胞能复活, 那么植物种质就可无限期地在液氮中贮藏 (程志英, 2006)。植物种子含水量和超低温冷冻方式是影响种子超低温保存体系建立的关键因素。种子含水量无论是过高还是过低, 都会给种子带来严重伤害 (曾琳等, 2014a)。种子只有在适宜的含水量范围内, 采用合适的冷冻方式才能有效进行超低温保存, 高良姜种子超低温冷冻适宜含水量范围为 12.78%~13.58%, 最适冷冻方式为玻璃化冷冻

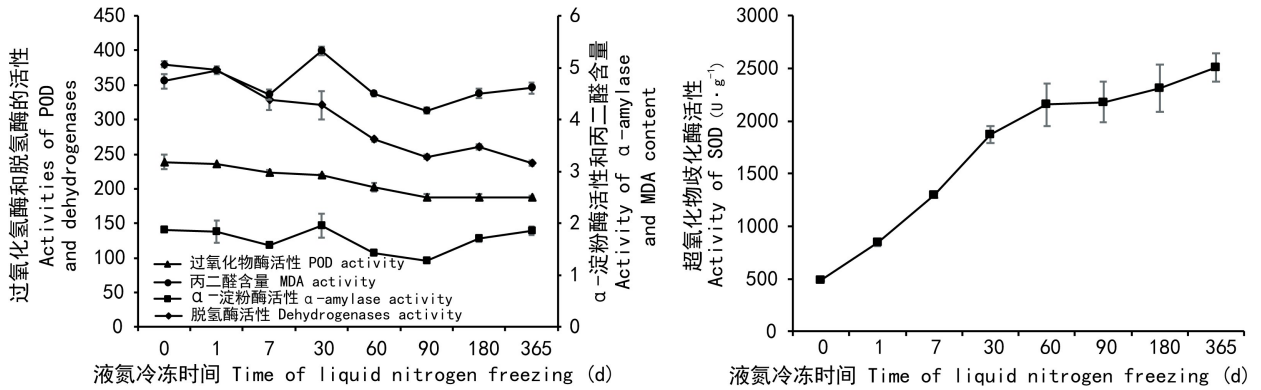


图 2 液氮冷冻时间对益智种子生化指标的影响

Fig. 2 Effects of liquid nitrogen freezing time on biochemical index of *A. oxyphylla* seeds

表 2 超低温保存对益智种子生理生化指标的影响

Table 2 Effects of cryopreservation on physiological and biochemical indexes of *A. oxyphylla* seeds

时间 Time (d)	发芽率 Germination rate (%)	α-淀粉酶活性 α-amylase activity (U · g ⁻¹)	超氧化物歧化酶活性 SOD activity (U · g ⁻¹)	过氧化物酶活性 POD activity (U · g ⁻¹)	丙二醛含量 MDA content (μmol · g ⁻¹)	脱氢酶活性 Dehydrogenases activity (μg · mL ⁻¹)
0	93.75±0.21a	1.88±0b	485.46±1.63g	238.7±5.39a	2.86±0.07c	141.19±1.98a
1	76.76±0.33b	1.84±0.11b	843.63±16.27f	235.41±0.47a	3.11±0.03b	136±0.04b
7	51.11±0.29e	1.57±0.01d	1293.03±10.68e	222.98±2.03b	2.91±0.05c	105.34±7.51c
30	52.5±0.13e	1.95±0.12a	1866.05±41.3d	219.47±0.65b	3.37±0.04a	101.37±10.32c
60	65±0.11c	1.42±0.03e	2152.81±104.51c	202.57±3.10c	3.08±0.03b	68.83±1.55d
90	62.5±0.59d	1.28±0.02f	2179.04±98.13c	188.07±2.51d	2.89±0.03c	58.12±1.38e
180	50±0.34f	1.71±0.04c	2313.16±114.32b	187.81±2.06d	2.79±0.05d	72.68±1.81d
365	52±0.4e	1.85±0.04b	2508.47±67.23a	187.44±1.00d	2.76±0.06d	49.26±2.00f

注:同一列不同小写字母表示不同冷冻时间同一生化指标差异极显著($P > F < 0.0001$)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate highly significantly differences of the biochemical indexes of seeds with the different time of liquid nitrogen freezing ($P > F < 0.0001$).

法(曾琳等,2014b);白木香种子超低温冷冻适宜含水量为7.35%,冷冻方式为直接冷冻法(刘军民等,2007);降香黄檀种子超低温冷冻适宜含水量范围为10.54%~12.35%,冷冻方式为玻璃化冷冻法(曾琳等,2014a)。本研究结果,益智种子超低温保存体系为含水量13.92%~14.38%,直接冷冻法。

液氮主要是对种子发芽率和生理生化指标有影响。淀粉酶是种子萌发初期物质能量代谢快速启动的基本保证,是种子顺利萌发的重要生理基础,而α-淀粉酶是淀粉酶重要的水解酶(赵玉锦和

王台,2001)。本研究结果显示,随着液氮冷冻时间的延长,益智种子发芽率稍有下降,但均在50%以上,且超低温冷冻对益智种子α-淀粉酶活性影响不大。

SOD、POD和脱氢酶是植物种子重要的保护酶,为植物细胞提供高效而专一的活性氧清除体系(钱红格,2009),其活性与植物种子的超低温耐性密不可分(宋红等,2016)。SOD是种子细胞自由基清除系统中专一清除的抗氧化酶,跟种子抗低温能力相关。王更亮(2011)在花烛胚性悬浮细

胞超低温保存实验中发现,液氮冷冻后的花烛 SOD 活性提高了,这与本实验结果是一致的,说明液氮冷冻增强了种子清除自由基的能力,有助于抵制活性氧水平的升高,从而降低超低温对种子活力的损伤。POD 可为种子萌发过程中清除细胞内脂质过氧化产生的毒害,宋红等(2016)等在对玉蝉花种子进行液氮冷冻实验时发现,液氮冷冻后的玉蝉花种子 POD 活性降低了,而程志英(2006)和王更亮(2011)分别对菊花茎尖和花烛胚性细胞进行超低温冷冻时发现,液氮冷冻使菊花茎尖和花烛胚性细胞的 POD 活性提高了。本实验益智种子 POD 活性随着液氮冷冻时间的延长而有所下降,说明在液氮冷冻刺激下,种子抗氧化能力减弱了。脱氢酶的活性与种子生命活动强弱有着重要相关性(史锋厚等,2005),益智种子发芽率随着液氮冷冻时间的延长而有所下降,而种子脱氢酶活性随着超低温冷冻时间的延长显著下降,说明脱氢酶活性与种子发芽率呈正相关。

丙二醛是膜质过氧化物产物之一,会抑制细胞保护酶的活性,降低抗氧化物的含量(钱红格,2009;唐祖君和宋明,1999)。刘晓东等(2013)在对大苞鞘石斛原球茎进行液氮冷冻处理时发现,液氮超低温处理使得大苞鞘石斛原球茎 MDA 的含量升高了。而益智种子经液氮冷冻后,MDA 含量先是呈上升趋势,表明超低温冷冻过程中细胞膜质过氧化物不断加重;但冻存 90 d 后益智种子 MDA 含量开始下降,直至趋于稳定,说明随着冻存时间的延长,益智种子细胞活动已逐渐停止,达到生态稳定状态。

超低温保存方法成功与否,通常是以液氮处理种子一段时间后是否还有一定活力来判定的(唐安军和龙春林,2007)。本研究结果显示,液氮冷冻时间对益智活力有一定的影响,但对种子的有些性能具有一定的促进作用。无论是发芽率,还是生理生化指标,都不同程度表明液氮超低温保存益智种子是可行的。

参考文献:

BYRON Z, INAUDIS C, LOURDES Y, 2013. Biochemical

characterization of ecuadorian wild *Solanum lycopersicum* Mill. plants produced from non-cryopreserved and cryopreserved seeds [J]. *CryoLetters*, 34(4):413-421.

CEJAS I, MENDEZ R, VILLALOBOS A, et al, 2013. Phenotypic and molecular characterization of *Phaseolus vulgaris* plants from non-cryopreserved and cryopreserved seeds [J]. *AJPS*, 4: 844-849.

CHENG ZY, 2006. Physiological and biochemical and structure characteristics of chrysanthemum shoot tips during cryopreservation [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University: 20-28. [程志英, 2006. 菊花茎尖超低温处理过程中的相关生理生化与结构变化 [D]. 南京: 南京农业大学: 20-28.]

HE YH, FU YQ, LIU Y, 2013. Cryopreservation seeds of *Albizia julibrissin* and *Picea wilsonii* [J]. *Seed*, 3(80):33-40. [河英虎, 傅伊倩, 刘燕, 2013. 合欢和青杆种子超低温保存研究 [J]. *种子*, 3(80):33-40.]

HUANG GQ, 2013. The culture technology of *Alpinia oxyphylla* Miq [J]. *Guangdong For Sci Technol*, 29(2):74-76. [黄国琦, 2013. 益智丰产栽培技术 [J]. *广东林业科技*, 29(2):74-76.]

LI HS, 2000. Principle and technology of plant physiological and biochemical experiments [M]. Beijing: Higher Education Press: 167-169. [李合生, 2000. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社: 167-169.]

LIU JM, XU ZQ, XU HH, et al, 2007. Study on cryopreservation of seeds of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. [J]. *J Guangzhou Univ Trad Chin Med*, 24(5):414-415. [刘军民, 徐梓勤, 徐鸿华, 等, 2007. 白木香种子的超低温保存研究 [J]. *广州中医药大学学报*, 24(5):414-415.]

LIU XD, LI XD, WU YL, et al, 2013. Physiological and biochemical characteristics of *Dendrobium wardianum* protocorms during cryopreservation [J]. *J NE For Univ*, 41(7):79-84. [刘晓东, 李晓丹, 吴元玲, 等, 2013. 大苞鞘石斛原球茎超低温保存中生理生化变化 [J]. *东北林业大学学报*, 41(7):79-84.]

QIAN HG, 2009. Study on seed germination characteristics and seed vigor changes of three elm species [D]. Yangling: Northwest A & F University: 7-9. [钱红格, 2009. 三种榆属树种种子萌发特性及活力变化的研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学: 7-9.]

ROBERTS EH, 1973. Predicting the storage life of seeds [J]. *Seed Sci & Technol*, 1:499-514.

ROBERTS EH, 1975. Problems of long term storage of seed and pollen for genetic resources conservation [M]// FRANKEL OH, HAWKES JG. *Crop genetic resources for today and tomorrow*. London: Cambridge University Press: 269-294.

SAKAI A, KOBAYASHI S, OIYAMA I, 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification [J]. *Plant Cell REP*, 9(1):30.

SHI HF, YU FY, SHEN YB, et al, 2005. Cryopreservation of chinese pine seeds [J], *J Nanjing For Univ*, 29(6):119-

122. [史锋厚, 喻方圆, 沈永宝, 等, 2005. 超低温贮藏对油松种子的影响 [J]. 南京林业大学学报, 29(6):119-122.]
- SONG H, CAO B, WANG L, 2016. Physiological and biochemical characteristics of *Iris ensata* seeds after cryopreservation [J]. *J NE For Univ*, 44(4):44-47. [宋红, 曹柏, 王玲, 2016. 超低温保存对玉蝉花种子生理生化特性的影响 [J]. 东北林业大学学报, 44(4):44-47.]
- TANG AJ, LONG CL, 2007. Cryopreservation of recalcitrant seed germplasm [J]. *Guihaia*, 27(5):759-764. [唐安军, 龙春林, 2007. 低温保存技术在顽拗性种子种质保存中的利用 [J]. 广西植物, 27(5):759-764.]
- TANG ZJ, SONG M, 1999. Physiological and biochemical analysis of artificially aged chinese cabbage [*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson] [J]. *Acta Horti Sin*, 26(5):319-322. [唐祖君, 宋明, 1999. 大白菜种子人工老化及劣变的生理生化分析 [J]. 园艺学报, 26(5):319-322.]
- WANG GL, 2011. The cryopreservation of anthurium by vitrification and their physiological and histological characteristics [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University: 39-49. [王更亮, 2011. 花烛玻璃化超低温保存及相关生理生化和组织学特征 [D]. 南京: 南京农业大学: 39-49.]
- WANG H, LEI XJ, SONG J, et al, 2015, Advances in study of medical plant germplasm cryopreservation and genetic variation [J]. *Spec Wild Ecol Anim Plant Res*, 2(6):70-78. [王晗, 雷秀娟, 宋娟, 等, 2015. 药用植物种质资源超低温保存及遗传变异特性研究进展 [J]. 特产研究, 2(6):70-78.]
- WANG LN, CHEN SF, ZHANG B, et al, 2009. Research on determination of polysaccharides contents by DNS method [J]. *J Jilin Med Coll*, 30(4):232-234. [王丽娜, 陈水钊, 张兵, 等, 2009. 3,5-二硝基水杨酸法测定多糖含量的研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 30(4):232-234.]
- ZENG L, HE MJ, CHEN K, et al, 2014a. Cryopreservation of seeds and embryos in *Dalbergia odorifera* T. Chen [J]. *China J Chin Mat Med*, 39(12):2263-2266. [曾琳, 何明军, 陈葵, 等, 2014a. 降香黄檀种子和离体胚超低温保存研究 [J]. 中国中药杂志, 39(12):2263-2266.]
- ZENG L, HE MJ, CHEN K, et al, 2015. Cryopreservation of seeds in *Alpinia officinarum* Hance [J]. *Crop Sci Soc Chin*: 129-134. [曾琳, 何明军, 陈葵, 等, 2015. 益智种子超低温长期保存方法探究 [J]. 中国作物学会作物种子专业委员会: 129-134.]
- ZENG L, HE MJ, CHEN K, et al, 2014b. Study on cryopreservation of *Alpinia officinarum* Hance seeds [J]. *Chin Agric Bull*, 30(28):164-148. [曾琳, 何明军, 陈葵, 等, 2014b. 高良姜种子超低温保存研究 [J]. 中国农学通报, 30(28):164-148.]
- ZHANG HR, 1999. The principle and method of biochemistry test [M]. Yinchuan: Ningxia People's Publishing Press: 59-63. [张慧茹, 1999. 生物化学试验原理和方法 [M]. 银川: 宁夏人民出版社: 59-63.]
- ZHANG SZ, XU PF, WU JJ, 2012. Physiology experiment of crop seed [M]. Beijing: Chemical Industry Press: 75-76. [张淑珍, 徐鹏飞, 吴俊江, 2012. 作物种子生理学实验 [M]. 北京: 化学工业出版社: 75-76.]
- ZHAO YJ, WANG T, 2001. Analysis of the relationship between α -amylase and germinating rate of rice seeds during the process of seed germination [J]. *Chin Bull Bot*, 18(2):226-230. [赵玉锦, 王台, 2001. 水稻种子萌发过程中 α -淀粉酶与萌发速率关系的分析 [J]. 植物学通报, 18(2):226-230.]