

葱韭类蔬菜种质资源种子超低温保存技术研究

赵丹琦, 宋江萍, 贾会霞, 张晓辉, 阳文龙, 武亚红, 宋哲, 王海平

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所 / 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100081)

摘要: 葱韭类蔬菜种子属于短命性种质, 常规低温保存难以实现资源的长期保存, 因此, 开展针对葱韭类种质资源的超低温保存技术研究具有重要意义。本研究对韭菜、大葱、韭葱、洋葱 4 种葱韭类蔬菜共 30 份资源进行了超低温保存方法研究。通过 PVS2 处理时间、复温温度、复温时间 3 个因素, 每个因素 4 水平进行正交试验, 以超低温保存后种子发芽率与未经超低温处理的种子发芽率比值对各试验组合进行评价, 结果表明: PVS2 处理时间和复温时间有显著性差异 ($P < 0.05$), 最佳试验组合为 $A_1B_1C_1$, 即种子经过植物玻璃化溶液 (PVS2) 处理 0 h, 放入液氮, 取出后在 40 °C 的恒温环境下复温 4 h。通过对洋葱品种泰星紫冠、大葱品种裕丰高杆、韭菜品种紫根韭菜以及韭葱品种 E0004 的实试验证, 证明了最佳试验组合的实际效果。对最佳试验组合种子的超氧化物歧化酶活性、过氧化物酶活性、过氧化氢酶活性、丙二醛含量进行测定, 结果表明: 经过液氮超低温保存后种子的丙二醛含量下降, 超氧化物歧化酶活性经液氮处理之后高于对照, 液氮冷冻后的韭菜种子过氧化物酶活性降低, 大葱、洋葱、韭葱过氧化物酶活性增高。研究结果将为葱韭类蔬菜种质资源超低温保存提供技术储备。

关键词: 葱韭类种质资源; 超低温保存; 抗氧化酶活性; 种子活力

Study on Cryopreservation Method of *Allium* Crop Germplasm

ZHAO Dan-qi, SONG Jiang-ping, JIA Hui-xia, ZHANG Xiao-hui, YANG Wen-long,

WU Ya-hong, SONG Zhe, WANG Hai-ping

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Horticultural Crop Biology and Germplasm Creation in the Ministry of Agriculture, Beijing 100081)

Abstract: *Allium* crop germplasm is ephemeral vegetable due to its short-lived seeds. Application of the conventional low-temperature preservation is difficult to achieve long-term preservation. It is therefore of great significance to set up the cryopreservation procedure specific to the allium germplasm. In the present study, through the orthogonal experiment of three factors with four levels, we examined the cryopreservation methods using 30 accessions of four allium vegetables (*Allium tuberosum* Rottler ex Sprengle, *Allium fistulosum* L. var. *giganteum* Makino, *Allium porrum* L. and *Allium cepa* L.). These results was evaluated by the germination rate of the seeds after cryopreservation if compared to the germination rate of the seeds without treatments. The results showed significant differences among the ANOVA experiments ($P < 0.05$), while the optimal procedure was the

收稿日期: 2022-05-27 修回日期: 2022-06-22 网络出版日期: 2022-07-05

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220527002>

第一作者研究方向为种质资源, E-mail: 1016508053@qq.com

通信作者: 王海平, 研究方向为种质资源, E-mail: wanghaiping@caas.cn

基金项目: 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术 (CARS-24-A-01) ; 国家自然科学基金项目 (31872946) ; 中国农业科学院创新工程项目 (CAAS-ASTIP-2017-IVFCAAS, CAAS-XTX2018021) ; 农业农村部作物种质资源安全保存项目 (2022NWB037) ; 国家园艺种质北京蔬菜分库运行服务项目 (NHGRC2022-NH01) ; 国家作物种质资源数据中心观测监测任务项目 (ZX01NK-03)

Foundation projects: China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-24-A-01), National Natural Science Foundation of China (31872946), Science and Technology Innovation Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ASTIP-2017-IVFCAAS, CAAS-XTX2018021), Safe Preservation Project of Crop Germplasm Resources of MOF (2022NWB037), National Horticultural Germplasm Centre Project (NHGRC2022-NH01), Observation and Monitoring Mission Project of National Crop Germplasm Resources Data Center (ZX01NK-03)

A₁B₄C₁ (without cryoprotectant PVS2 treatment, storage in liquid nitrogen, and rewarming for 4 h at 40 °C before testing the germination rate). We also determined the physiological indexes of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) activity, catalase (CAT) activity, malondialdehyde (MDA) content of cryopreservation seeds after seed rewarming. The MDA content of the seeds decreased after ultra-low temperature preservation of liquid nitrogen, while the SOD activity was higher than that of the control after the liquid nitrogen treatment. A decrease on the POD activity of *A. tuberosum* Rottler ex Sprengle, after liquid nitrogen treatment and an increase on the POD activity of *A. porrum* L., *A. fistulosum* L. var. *giganteum* Makino and *A. cepa* L. were detected. Collectively, these results provided optimal cryopreservation procedure for *Allium* vegetable germplasm resources.

Key words: *Allium* crop germplasm; cryopreservation; antioxidant enzyme activity; seed vigo

葱韭蔬菜主要包括韭菜、洋葱、韭葱、大葱等,富含糖分、维生素 C 以及硫、磷、铁等矿物质,并含有杀菌物质,有促进食欲、调味、去腥和医疗等作用。在我国,韭菜的栽培历史达 3000 年以上,并且具有丰富的野生和栽培驯化品种资源^[1]。葱韭 (*Allium porrum* L.) 主要是以假茎、鳞茎、嫩苗和花薹供食用^[2],例如,大葱 (*Allium fistulosum* L. var. *giganteum* Makino) 是以叶鞘组成的肥大假茎和嫩叶为食^[3]。洋葱 (*Allium cepa* L.) 主要是以鳞茎为食用器官^[4]。葱韭类蔬菜作为重要的药菜兼用型特色蔬菜,越来越受到重视^[5]。

葱韭类种质资源类型多样,遗传多样性非常丰富,主要以种子的形式收集保存,并服务于育种和产业发展^[6]。葱韭类蔬菜种子属于短命种子,例如,常温下韭菜种子只能使用 1 年,在 0 °C 左右保存时,第 2~3 年因为种子发芽或田间成苗率太低,一般不能再使用^[7]。对于葱韭类蔬菜种质资源保存,目前主要方法是以种子贮藏于低温种质库中,但通过发芽率监测发现其保存效果仍然不理想。武亚红等^[8]研究结果表明种质库保存的 6 种葱属种子经过 21~30 年的储存后,6 种葱属蔬菜种子的生活力均呈现显著下降趋势,其中以分葱和洋葱最为严重。在保存实践中,种质资源保存库不得不耗费大量的人力物力不断监测预警这类种子的生活力,并每隔 2~5 年就要对这些资源进行繁殖更新,因此低温保存葱韭类种质资源的方法仍然不理想,长久安全地保存这些国家战略资源面临巨大挑战。

超低温保存作为离体保存技术的重要组成部分,具有环保、节约成本、方便等众多优点,是植物种质资源长期保存的理想方法^[9]。超低温保存是指在 -80 °C 以下的温度 (一般用液氮为冷源, -196 °C) 下对植物种质资源进行保存的技术。在超低温保存

环境下,植物种子几乎所有活细胞的物质代谢和生长活动处于相对稳定的生物学状态。这种方法能够保持生物材料的遗传稳定性,而且也不会丧失其形态发生的潜能^[10]。超低温保存技术可以保存和抢救物种,能避免物种突变的发生,是抢救性保护珍稀濒危种质资源的重要方法。超低温保存的方法主要有直接冷冻法、分步冷冻法、玻璃化法、干燥冷冻法、包埋脱水法等。目前,超低温保存技术已经成功应用于多种作物的种质保存。1922 年 Knowlton^[11]将金鱼草花粉冷冻到 -180 °C 后,仍获得一定程度的萌发率,这是超低温冷冻保存植物种质的最早报告。郑光植等^[12]在 1983 年成功地对药用植物的愈伤组织及其悬浮培养细胞进行了超低温保存,成为我国植物种质资源超低温保存研究的开创者。1985 年, Rall 等^[13]首次提出了一种有效的玻璃化溶液 (PVS1, plant vitrification solution1), 其中包含了 20.5 kg/L DMSO、15.5 kg/L 乙酰胺、10 kg/L 丙二醇、6 kg/L 聚乙二醇,这是应用高浓度玻璃化溶液慢速降温实现玻璃化的首次突破性进展。为了提高超低温保存后种源的成活率,前人对超低温保存过程的玻璃化方法进行了不断优化^[14]。尽管目前存在多种超低温保存植物材料的方法如采用小液滴玻璃化法保存甜樱桃砧木吉塞拉离体茎尖^[15]、蓝果忍冬茎尖^[16]、党参休眠芽^[17]、海岛棉 XH33 胚性细胞^[18],采用高糖预培养直接冷冻法保存水稻愈伤^[19],但到目前为止仍没有一种可对所有植物材料进行保存的方法。因此,要根据植物材料特点和种子的类型研发适合的保存方法。此外,在试验材料经溶液浸泡、液氮冷冻以及不同复温方式处理后试验材料活力和生理生化指标不可避免会受到影响,如经液氮处理后用自来水复温多数玉蝉花种子的过氧化物酶活性高于室温复温的种子^[20],采用快速复温方法胡杨种子各种酶活性及种子丙二醛含量都

较低^[21]。

综上所述,葱韭蔬菜属于短命性种质,其长久安全保存面临巨大挑战,如何简易高效的保存葱韭类蔬菜种质资源缺乏技术参考,尚无针对葱韭类蔬菜种质资源的超低温保存技术,对葱韭类种子超低温保存后生理指标是否发生变化以及变化规律尚不清楚。本研究旨在探索适于葱韭类蔬菜资源的液氮超低温保存的技术方法,并对超低温保存后的种子进行生理指标测定,为液氮超低温保存方法长期保存葱韭类种质资源提供理论参考和技术支撑。

表 1 供试种质资源基本信息

Table 1 Basic information on germplasm resources for testing

品种 Variety	原始发芽率(%) Original germination rate	品种 Variety	原始发芽率(%) Original germination rate	品种 Variety	原始发芽率(%) Original germination rate
韭菜 A0114 <i>Allium tuberosum</i> Rottler ex Sprengle.A0114	98	韭菜 A0113 <i>Allium tuberosum</i> Rottler ex Sprengle.A0113	55	大葱 B0108 <i>Allium fistulosum</i> L. var. <i>giganteum</i> Makino B0108	42
韭菜 A0115 <i>Allium tuberosum</i> Rottler ex Sprengle.A0115	96	韭菜 A0013 <i>Allium tuberosum</i> Rottler ex Sprengle.A0013	53	大葱 B0029 <i>Allium fistulosum</i> L. var. <i>giganteum</i> Makino B0029	41
韭菜 A0037 <i>Allium tuberosum</i> Rottler ex Sprengle.A0037	90	韭菜 A0201 <i>Allium tuberosum</i> Rottler ex Sprengle.A0201	43	洋葱 D0056 <i>Allium cepa</i> L.D0056	41
韭菜 A0018 <i>Allium tuberosum</i> Rottler ex Sprengle.A0018	86	大葱 B0208 <i>Allium fistulosum</i> L. var. <i>giganteum</i> Makino B0208	90	洋葱 D0047 <i>Allium cepa</i> L.D0047	64
韭菜 A0182 <i>Allium tuberosum</i> Rottler ex Sprengle.A0182	74	大葱 B0194 <i>Allium fistulosum</i> L. var. <i>giganteum</i> Makino B0194	90	洋葱 D0043 <i>Allium cepa</i> L.D0043	61
韭菜 A0022 <i>Allium tuberosum</i> Rottler ex Sprengle.A0022	69	大葱 B0148 <i>Allium fistulosum</i> L. var. <i>giganteum</i> Makino B0148	88	洋葱 D0068 <i>Allium cepa</i> L.D0068	61
韭菜 A0053 <i>Allium tuberosum</i> Rottler ex Sprengle.A0053	60	大葱 B0043 <i>Allium fistulosum</i> L. var. <i>giganteum</i> Makino B0043	82	洋葱 D0023 <i>Allium cepa</i> L..D0023	59
韭菜 A0072 <i>Allium tuberosum</i> Rottler ex Sprengle.A0072	58	大葱 B0201 <i>Allium fistulosum</i> L. var. <i>giganteum</i> Makino B0201	72	韭葱 E0005 <i>Allium porrum</i> L. E0005	49
韭菜 A0064 <i>Allium tuberosum</i> Rottler ex Sprengle.A0064	56	大葱 B0062 <i>Allium fistulosum</i> L. var. <i>giganteum</i> Makino B0062	68	韭葱 E0006 <i>Allium porrum</i> L.E0006	86
				韭葱 E0008 <i>Allium porrum</i> L.. E0008	82
				韭葱 E0003 <i>Allium porrum</i> L. E0003	82
				韭葱 E0007 <i>Allium porrum</i> L. E0007	74

1 材料与方法

1.1 材料

用于超低保存技术研发的供试材料为韭菜、大葱、洋葱、韭葱共 30 份发芽率不同的种质(表 1),于 2021 年 4 月从中国农业科学院蔬菜花卉研究所国家蔬菜种质资源中期库获取。用于超低保存方法验证的材料洋葱品种泰星紫冠,大葱品种裕丰高杆,韭菜品种紫根韭菜,购买于种子市场;韭葱 E0004 从中国农业科学院蔬菜花卉研究所国家蔬菜种质资源中期库获取。

1.2 试验方法

1.2.1 种子超低温保存正交试验 本研究利用正交试验对葱韭类种子的超低温保存方法进行研究, 设置 PVS2 处理时间、复温温度、复温时间 3 个因素, 每个因素设置 4 个水平(表 2)。利用 SPSS 软件正交设计生成 3 个因素 4 个水平 $L_{16}(4^3)$ 正交表 16 个处理, 每个处理 3 次重复, 取 50 粒种子放置在培养皿中, 用滴管吸取冷冻保护剂 PVS2 分别浸泡 0 min、20 min、30 min、40 min, 浸泡后将 PVS2 溶液吸出, 取出种子并用滤纸吸取种子表面残留 PVS2 后放入冻存管中投入液氮罐, 放置 24 h 后进行复温; 复温分别在 4 ℃、25 ℃、30 ℃、40 ℃四种不同梯度下, 放置 4 h、10 h、16 h、24 h。复温结束后立即对种子进行发芽试验并统计发芽率, 以未经过任何处理的种子(对照)原始发芽率为对照, 两者发

表 2 正交试验设计表

Table 2 Orthogonal design of experiments table

处理 Test	因子 Factor			空白列 Blank column
	PVS2 处理 时间(A)	复温温度(B)	复温时间 (C)	
	PVS2 processing time(A)	Thaw temperature (B)	Thaw time (C)	
1	A ₁	B ₁	C ₁	1
2	A ₁	B ₂	C ₂	2
3	A ₁	B ₃	C ₃	3
4	A ₁	B ₄	C ₄	4
5	A ₂	B ₁	C ₂	3
6	A ₂	B ₂	C ₁	4
7	A ₂	B ₃	C ₄	1
8	A ₂	B ₄	C ₃	2
9	A ₃	B ₁	C ₃	4
10	A ₃	B ₂	C ₄	3
11	A ₃	B ₃	C ₁	2
12	A ₃	B ₄	C ₂	1
13	A ₄	B ₁	C ₄	2
14	A ₄	B ₂	C ₃	1
15	A ₄	B ₃	C ₂	4
16	A ₄	B ₄	C ₁	3

A₁~A₄ 分别为 0 min、20 min、30 min、40 min; B₁~B₄ 分别为 4 ℃、25 ℃、30 ℃、40 ℃; C₁~C₂ 分别为 4 h、10 h、16 h、24 h; PVS2: 植物玻璃化溶液 2; 空白列: 没有其他设置因素, 不需要做实验, 是为了估计出随机误差进而进行方差分析而设置

A1-A4 are 0 min, 20 min, 30 min, 40 min respectively; B1-B4 are 4 ℃, 25 ℃, 30 ℃, 40 ℃ respectively; C1-C2 are 4 h, 10 h, 16 h, 24 h respectively; PVS2: Plant vitrification solution 2; Blank column: There are no other setting factors in the blank column, and no experiment is required. It is a blank column set for estimating random errors and then performing variance analysis

芽率比值(超低温保存后种子发芽率/对照种子发芽率 × 100%)作为试验结果, 评价不同组合的试验效果, 得出最佳试验组合。

1.2.2 种子发芽试验 采用培养皿滤纸法进行种子萌发试验, 透明塑料培养皿, 先将灭菌后的滤纸用蒸馏水浸湿放入规格为 90 mm × 20 mm 的培养皿中, 将未经任何处理的种子(对照)及表 2 中 16 组处理种子均匀散放在铺有滤纸的培养皿中, 在 20 ℃人工培养箱中进行传统种子发芽试验。每个处理 3 次重复, 每个重复 50 粒种子, 根据国家标准《农作物种子检验规程》在培养后第 12 d 统计发芽种子并记录。

为验证正交试验分析结果, 对市场购买的 3 个品种及 E004 的种子处理后进行发芽试验, 补充最佳试验组合处理, 其他处理方法同上。

1.2.3 生理指标测定 为了检测超低温保存种子生理变化, 对其生理指标进行测定。本试验测定大葱、韭菜、洋葱、韭葱未经任何处理(对照)及最佳试验组合种子的丙二醛含量、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、过氧化物酶活性。采用丙二醛含量试剂盒测定丙二醛含量, 采用过氧化氢酶试剂盒测定过氧化氢酶活性, 采用过氧化物酶试剂盒测定过氧化物酶活性, 采用超氧化物歧化酶 -WST-8 法测定试剂盒测定超氧化物歧化酶活性。上述所应用的试剂盒均来自苏州格锐思生物科技有限公司。称取 0.1 g 最佳试验组合种子样本, 加入 1 mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 然后 4 ℃, 12000 r/min 离心 10 min, 提取上清液, 置于冰上用试剂盒检测, 3 次生物学重复。

1.3 统计分析

通过 SPSS 22 软件, 生成 3 因素 4 水平正交表, 并应用 SPSS 中 Duncan 方法对正交试验结果发芽率比值进行方差统计分析。利用 Excel 软件比较 PVS2 处理时间、复温时间、复温温度 3 个因素的水平超低温保存前后种子发芽率比值总和及其平均值和极差大小。

2 结果与分析

2.1 超低温保存正交试验最佳试验组合分析

对正交试验结果发芽率比值(表 3)进行因素方差分析。结果表明, 3 个因素对超低温保存前后种子发芽率比值影响大小的顺序为 PVS2 处理时间、复温时间、复温温度(表 4)。PVS2 处理时间和复温时间的 *P* 值均小于 0.05, 说明 PVS2 处理时间和复温时间对发芽率比值有显著影响, 复温温度对发芽率比值影响不明显。

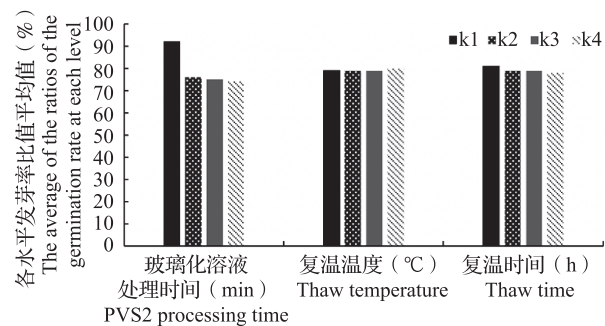
表 3 正交试验结果表
Table 3 Orthogonal test result table

处理 Test	发芽率比值(%) Germination rate ratio	处理 Test	发芽率比值(%) Germination rate ratio	处理 Test	发芽率比值(%) Germination rate ratio	处理 Test	发芽率比值(%) Germination rate ratio
1	93	5	74	9	75	13	72
2	92	6	78	10	73	14	74
3	92	7	75	11	75	15	74
4	91	8	75	12	77	16	76

表 4 正交试验因素方差分析表
Table 4 Analysis of variance table of orthogonal test factor

因素 Factor	偏差平方和 The sum of squares of the deviations	自由度 Degree of freedom	平均偏差平方和 The average deviation sum of squares	F 值 F value	F 临界值 F critical value	P 值 P-value
PVS2 处理时间 (A) PVS2 processing time (A)	888.75	3.00	296.25	711.06	3.29	0.00
复温温度 (B) Thaw temperature (B)	2.25	3.00	0.75	1.86	3.29	0.25
复温时间 (C) Thaw time (C)	22.25	3.00	7.42	17.86	3.29	0.00
误差 Error	2.50	6.00	0.42			
合计 Total	915.75	15.00				

由图 1 可见,发芽率比值随着 PVS2 处理时间增加逐渐下降,结合方差分析结果,可确定影响发芽率比值的主要因素为 PVS2 处理时间,最优水平为 PVS2 处理 0 h;而复温温度和复温时间不同水平对超低温保存前后发芽率比值影响变化较为平缓,说明复温温度和复温时间对发芽率比值影响相对较小。



k1、k2、k3、k4 分别为一水平 (A₁、B₁、C₁)、二水平 (A₂、B₂、C₂)、三水平 (A₃、B₃、C₃)、四水平 (A₄、B₄、C₄); 下同
k1, k2, k3, k4 are one level (A₁, B₁, C₁), two level (A₂, B₂, C₂), three level (A₃, B₃, C₃), four level (A₄, B₄, C₄) respectively;
The same as below

图 1 各因素效应图

Fig. 1 Effect diagram of each factor

正交试验直观分析表(表 5)比较不同因素水平的发芽率比值的平均值 k 值以及极差 R 值, k 值越大表明该水平越优, R 值越大说明该因素对发芽率比值的影响越大。通过表 5 可以看出, PVS2 处理时间中水平 1 的 k 值最大, 即经过 PVS2 处理 0 h 的超低温保存前后种子发芽率比值的平均值最大, 表明水平 1 最优; 复温温度中水平 4 的 k 值最大, 即在 40 ℃ 恒温下进行复温后发芽率比值的平均值最大, 表明水平 4 最优; 复温时间中水平 1 的 k 值最大, 即复温 4 h 后发芽率比值的平均值最大, 表明水平 1 最优。本研究中通过直观分析法得出本试验的最佳试验组合为 A₁B₄C₁, 即经过 PVS2 处理 0 h 在 40 ℃ 恒温下复温 4 h。

2.2 正交试验最佳组合效果验证

为验证最佳试验组合 A₁B₄C₁ 的实际效果, 将 4 种葱韭验证材料分别进行了 16 种试验组合方法及最佳试验组合 A₁B₄C₁ 超低温保存处理, 通过发芽率进行效果评价。通过直观分析表 6 可以看出, 这与前次正交试验结果一致, 表明 A₁B₄C₁ 仍为最佳试验组合。

表 5 正交试验结果直观分析表

Table 5 Intuitive analysis table of orthogonal test results

统计量 Statistics		因素 Factor			
		PVS2 处理时间 (A)	复温温度 (B)	复温时间 (C)	空白列
		PVS2 processing time (A)	Thaw temperature (B)	Thaw time (C)	Blank column
各水平发芽率比值平均值	k1	92	79	81	80
The average of the ratios of the germination rates at each level	k2	76	79	79	79
	k3	75	79	79	79
	k4	74	80	78	80
极差 Extremely poor	R	18	1	3	1

R 为极差,下同

R is the extremely poor, the same as below

表 6 正交试验验证结果直观分析表

Table 6 Intuitive analysis table of orthogonal test verification results

统计量 Statistics		因素 Factor			
		PVS2 处理时间 (A)	复温温度 (B)	复温时间 (C)	空白列
		PVS2 processing time (A)	Thaw temperature (B)	Thaw time (C)	Blank column
各水平发芽率平均值	k1	90.00	74.75	78.00	75.5
The average of the germination rates at each level	k2	75.00	74.50	74.75	75.7
	k3	68.75	72.25	72.75	74.5
	k4	65.25	77.00	73.50	73.5
极差 Extremely poor	R	24.75	4.25	5.25	2

通过 4 种葱韭超低温保存实践,结果表明:以大葱为试验材料,CK 的发芽率为 58%,最佳试验组合 A₁B₄C₁ 处理种子发芽率为 57%,16 组处理的最高种子发芽率为 55%。以韭菜为试验材料,CK 的发芽率为 49%,最佳试验组合 A₁B₄C₁ 处理种子发芽率为 49%,16 组处理的最高种子发芽率 45%。以洋葱为试验材料,CK 的发芽率为 87%,最佳试验组合 A₁B₄C₁ 处理种子发芽率 87%,16 组

处理的最高种子发芽率 83%,以韭葱为试验材料,CK 的发芽率为 67%,最佳试验组合 A₁B₄C₁ 处理种子发芽率 67%,16 组处理的最高种子发芽率 65% (表 7)。发芽率方差分析结果表明 (表 7):大葱、韭菜、洋葱、韭葱最佳组合 A₁B₄C₁ 处理种子发芽率均高于表 7 中 16 组处理后的种子发芽率,且与 CK 无显著性差异,无论是直观分析还是方差分析结果均表明 A₁B₄C₁ 为超低温保存的最佳试验组合。

表 7 验证试验发芽率分析表

Table 7 Validation test germination rate analysis table

处理 Test	发芽率 (%) Germination rate			
	大葱	韭菜	洋葱	韭葱
	<i>Allium tuberosum</i> Rottler ex Sprengle.	<i>Allium fistulosum</i> L. var. <i>giganteum</i> Makino	<i>Allium cepa</i> L	<i>Allium porrum</i> L
CK	58a	49a	87a	67a
A1B4C1	57a	49a	87a	67a
1	53ab	45ab	83ab	63abc
2	55a	44abc	74c	65ab
3	48bc	37cdefg	74c	63abc

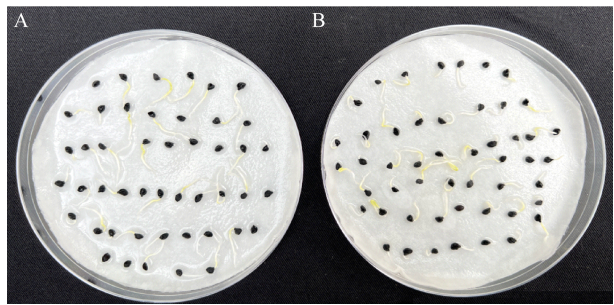
表 7(续)

处理 Test	发芽率(%) Germination rate			
	大葱 <i>Allium tuberosum</i> Rottler ex Sprengle.	韭菜 <i>Allium fistulosum</i> L. var. <i>giganteum</i> Makino	洋葱 <i>Allium cepa</i> L.	韭葱 <i>Allium porrum</i> L.
4	49bc	43abcd	79bc	65ab
5	43cd	38bcdef	61defg	51efg
6	33fg	41abcde	63de	58bcd
7	40de	38bcdef	59defg	53efg
8	37def	40bcdef	65d	56cde
9	33fg	32fg	62def	49fg
10	35efg	32fg	58defg	49fg
11	41de	35defg	55fg	53efg
12	35efg	32fg	61defg	54efg
13	29g	35defg	54g	47g
14	30g	33efg	56efg	48fg
15	29g	29g	55fg	50efg
16	39def	36cdefg	60defg	51efg

CK 为未经任何处理; A₁B₄C₁ 为最佳处理组合; 1~16 为正交表(表 2)中的 16 组处理; 不同小写字母表示在 P<0.05 水平下差异显著,下同
CK: Without any treatment; A₁B₄C₁: The best treatment combination; 1-16: The orthogonal table (table 2) 16 sets of treatments; The different lowercase letters after the values indicate that they are significant at the P<0.05 level, the same as below

2.3 超低温保存前后种子活力测定

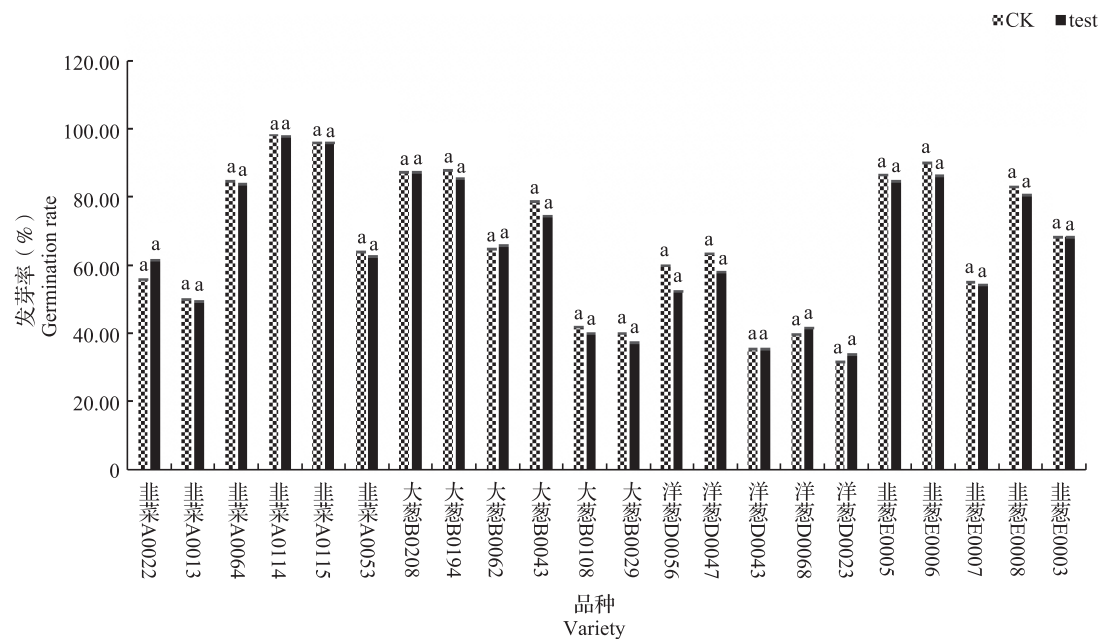
2.3.1 超低温保存前后种子发芽率及植株长势对比 为了验证经过超低温保存后种子的生活力,将复温后的种子在 20 ℃进行发芽并移栽到培养钵中。从结果可以看出, A₁B₄C₁ 处理的种子仍可保持原有的生活力(图 2),其发芽率与未经任何处理的种子无显著差异(图 3),并可成功生长发育成完整植株(图 4)。



A: 对照组发芽种子; B: A₁B₄C₁ 处理的发芽种子
A are the germinated seeds of control group;
B are the germinated seeds after A₁B₄C₁ treated
图 2 超低温保存处理前后种子发芽第 7 天图片
Fig. 2 Picture of seed germination day 7 before and after cryopreservation

2.3.2 超低温保存前后种子生理指标变化 进一步研究分析大葱、韭菜、洋葱、韭葱品种未经任何处理

以及 A₁B₄C₁ 处理种子的丙二醛含量、过氧化物酶活性、超氧化物歧化酶活性、过氧化氢酶活性变化。
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。结果表明经过 A₁B₄C₁ 处理的大葱、韭菜、洋葱、韭葱内丙二醛含量低于对照组,呈下降趋势,但无显著差异(图 5A)。超低温保存前后丙二醛含量无显著差异说明 A₁B₄C₁ 处理种子没有受到明显胁迫,即不经 PVS2 处理在 40 ℃复温 4 h 处理方法对葱韭类种子伤害不大,丙二醛含量降低表明超低温冷冻过程中细胞膜质过氧化物减少,更加有利于种子萌发。
超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化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,其活性与植物种子的超低温耐性密不可分。试验结果表明 A₁B₄C₁ 处理的大葱、韭菜、韭葱、洋葱种子内部超氧化物歧化酶活力均高于对照组,其中韭菜 12 份种质中有 6 份、大葱 8 份种质中有 6 份、洋葱 5 份种质中有 4 份、韭葱 5 份种质中有 3 份有显著差异,其余种质无显著差异(图 5B)。此结果表明在液氮冷冻刺激下增强了种子清除自由基的能力,说明液氮超低温冷冻后有助于抑制活性氧水平升高,从而降低超低温对种子活力的损伤。



CK: 对照组种子; test: A₁B₄C₁ 处理的种子; 数值为平均值 ± 标准误; 下同
CK: Seed in the control group; test: Seed after A₁B₄C₁ treated plants; The values are average ± standard errors; the same as below

图 3 超低温保存处理前后种子发芽率比较
Fig. 3 Comparison of the germination rate of seeds germination before and after cryopreservation



A, C: 对照组植株; B, D: A₁B₄C₁ 处理的植株
A and C are the plants of control group; B and D are A₁B₄C₁ treated plants

图 4 超低温保存前后韭菜植株
Fig. 4 Chinese chive plants before and after cryopreservation

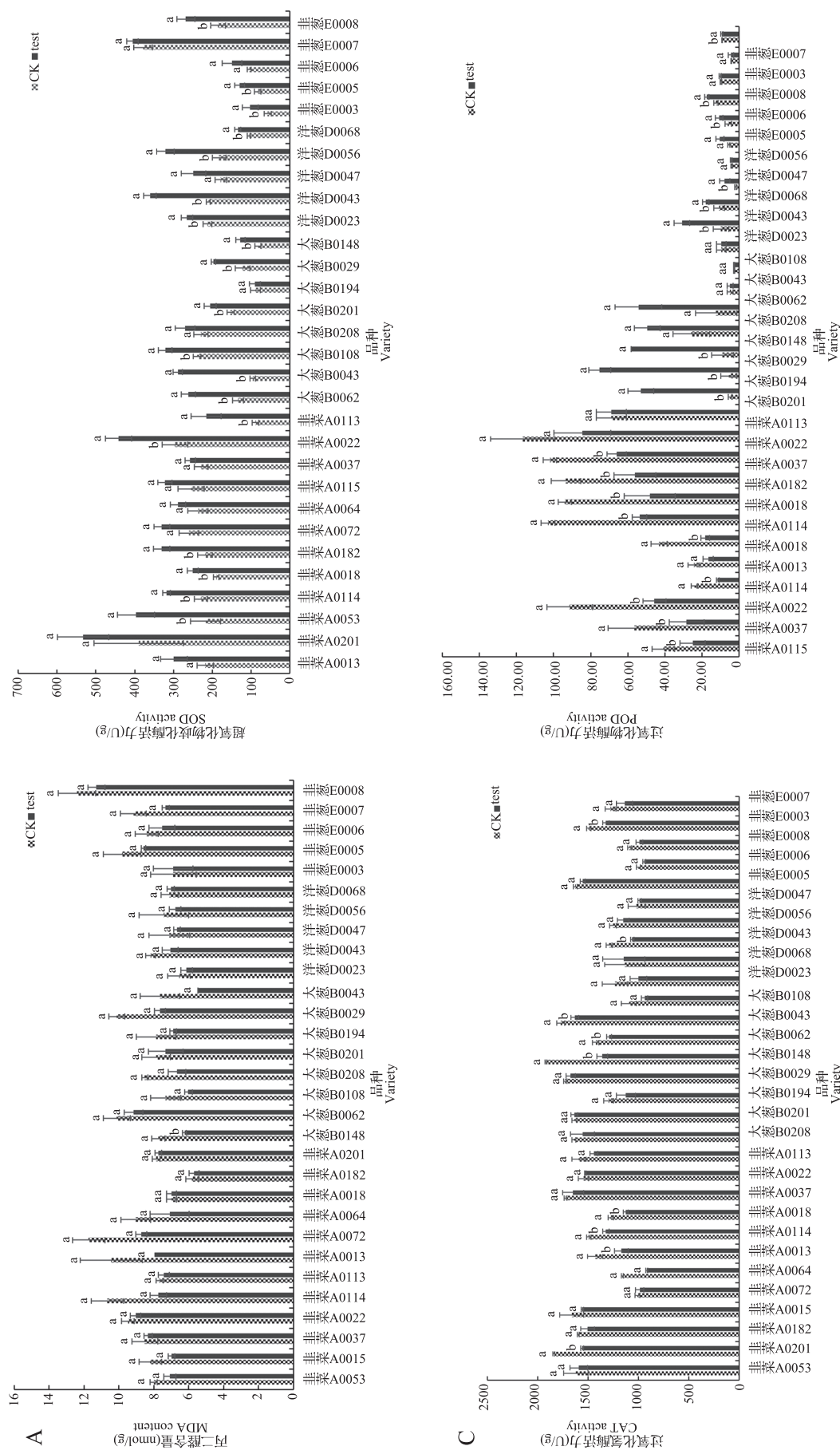


图 5 超低温保存前后生理指标变化情况
Fig. 5 Changes of physiological indexes before and after cryopreservation

过氧化氢酶和过氧化物酶可将植物内的过氧化氢分解成水。结果显示经 A₁B₄C₁ 处理的大葱、韭菜、洋葱、韭葱种子内过氧化氢酶活力略微低于对照组(图 5C), 其中韭菜 12 份种质中有 4 份、大葱 8 份种质中有 3 份、洋葱 5 份种质中有 1 份、韭葱 5 份种质中有 1 份有显著差异, 其余种质无显著差异。表明超低温处理方法对种子过氧化氢酶活性影响较小。

过氧化物酶可为种子萌发过程中清除细胞内脂质过氧化产生的毒害, 试验结果显示经 A₁B₄C₁ 处理的韭菜种子过氧化物酶活力低于对照组, 12 份种质中 9 份有显著差异; 韭葱、洋葱和大葱种子过氧化物酶活力高于对照组, 活力增高, 其中大葱 8 份种质中有 3 份、洋葱 5 份种质中有 3 份、韭葱 5 份种质中有 3 份有显著差异, 其余种质无显著差异(图 5D)。表明液氮冷冻后韭菜抗氧化能力降低, 韭葱、洋葱、大葱种子内部过氧化物酶上升表明种子抗氧化能力升高。

3 讨论

葱韭类蔬菜种质资源种子保存方式为脱水干燥后放入低温种质库保存, 但这种传统方法无法实现这类短命性种质的长久安全保存, 无法避免依靠不断的繁种来维持其遗传生长发育的能力。本研究通过不同基因型和不同发芽率的种质, 研发出了适合于葱韭类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。前人研究发现, 直接冷冻法在其他有性繁殖植物的种子中也成功应用。张晓宁等^[22]研究结果表明马尾松种子超低温保存的最优方法是将种子含水量控制在 6.1%, 直接投入液氮快速冷冻后室温空气缓慢复温, 冻后发芽率可在 90% 以上。本研究发现经 PVS2 浸泡后, 种子在发芽试验中发霉现象较为严重, 影响最终发芽率。PVS2 冷冻保护剂中含有蔗糖等化学物质, 试验过程中种子表面可能存在部分 PVS2 残留, 这可能是影响种超低温保存后存活率的原因之一。影响种子活力的生理生化活动主要是氧化损伤, 氧化损伤会导致抗氧化酶活性显著下降, 造成负氧离子和过氧化氢等活性氧积累, 引起脂质过氧化损伤, 导致膜系统完整性降低^[18], 从而影响种子活力, 在种子发芽率与其生理指标方面均有不同程度的表现。曾琳等^[23]研究表明超低温冷冻后, 益智种子中丙二醛含量是先上升后下降; 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, 过氧化氢酶活性则是持续下降。本研究表明经过液氮超低温保存后种子的丙二醛含量和过氧化氢酶活性与对照比较均无显著差异, 丙二醛含量和过氧化氢酶活性下降。超氧化物歧化酶活性和过氧化物酶活性在 $P < 0.05$ 水平上有显著差异, 经液氮处理之后超氧化物歧化酶活性均高于对照, 韭菜的过氧化物酶活性低于对照, 韭葱、大葱、洋葱内过氧化物酶活性升高。经液氮冷冻后的韭菜种子过氧化物酶活性降低, 这与曾琳等研究结果一致。不同之处在于大葱、韭葱和洋葱的过氧化物酶活性增高, 推测可能由于益智种子和韭菜种子均为多年生草本植物, 而大葱、韭葱、洋葱为 2~3 年草本植物, 其种子内部有不同的生理活性, 这需要在今后加以研究, 以便为选择合理的超低温保存技术提供理论参考。顾雅坤等^[24]分步冷冻处理肉豆蔻种子, 发现超低温保存前后过氧化氢酶活性差异不显著, 过氧化物酶活性和 α -淀粉酶活性升高, 这与本研究发现葱韭类种质资源超低温保存后丙二醛含量和超氧化物歧化酶活性结果一致, 认为超低温保存对部分植物种子有激活和刺激发芽的作用。这一推测需要对更多种类的植物种质进行更广泛的研究证实。

4 结论

葱韭类种质资源种子经过超低温保存后很好地保持了原有的生活力。研发的超低温保存技术即经 PVS2 处理 0 h 投入液氮、取出在 40 °C 的恒温环境下复温 4 h, 可应用于葱韭类蔬菜种质的长久保存, 可避免因常规保存活力降低造成种质资源丢失的风险, 减少常规保存中需要对活力低种质资源不断繁殖更新的人力和经济成本。

参考文献

- [1] 李莎莉, 吴琦, 徐帅, 苏莹, 许悦, 王丽虹, 刘阳. 韭菜生物活性及其药食资源开发进展. 食品研究与开发, 2018, 39(9): 197-202
Li S L, Wu Q, Xu S, Su Y, Xu Y, Wang L H, Liu Y. Advances in the bio-activities and the drug and food resources development of chives. Food Research and Development, 2018, 39(9): 197-202
- [2] 张德纯. 韭葱. 中国蔬菜, 2014(1): 93
Zhang D C. Leek. China Vegetables, 2014(1): 93
- [3] 中国农业科学院蔬菜花卉研究所. 中国蔬菜栽培学. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2010
Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences. Chinese vegetable cultivation. 2nd edn. Beijing: China Agricultural Press, 2010

- [4] 向伟勇, 许晓光. 全球化背景下中国洋葱产业发展的机遇与挑战. 中国蔬菜, 2022(1): 16-21
Xiang W Y, Xu X G. The development of China's onion industry in the context of globalization opportunities and challenges. China Vegetables, 2022(1): 16-21
- [5] 武亚红, 赵青, 王海平. 葱属植物分类研究进展. 园艺学报, 2021, 48(7): 1418-1428
Wu Y H, Zhao Q, Wang H P. Research progress on the classification of *Allium* plants. Acta Horticulturae Sinica, 2021, 48(7): 1418-1428
- [6] 巴图, 刘恩. 蔬菜种质资源的保存与蔬菜育种. 现代园艺, 2015(18): 210
Ba T, Liu E. Conservation of vegetable germplasm resources and vegetable breeding. Modern Horticulture, 2015(18): 210
- [7] 靖之. 韭菜种子的保存. 农家之友, 2011(4): 25
Jing Z. Preservation of leek seeds. Friends of the Farm Family, 2011(4): 25
- [8] 武亚红, 王海平, 李锡香, 宋江萍, 赵青, 张晓辉, 阳文龙. 国家蔬菜资源中期库中不同葱属蔬菜种子生活力监测. 植物遗传资源学报, 2020, 21(3): 648-654
Wu Y H, Wang H P, Li X X, Song J P, Zhao Q, Zhang X H, Yang W L. Monitoring seed viability of different *Allium* vegetables in the national medium-term genebank of vegetable germplasm resources. Journal of Plant Genetic Resources, 2020, 21(3): 648-654
- [9] Sakai A. Survival of plant tissue of super-low temperature. Contributions from the Institute of Low Temperature Science Hokkaido University, 1956, 42: 14-17
- [10] 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
- [11] Knowlton H E. Studies in pollen with special reference to longevity. Cornell University Agriculture Experiment Station Memoir, 1922, 52: 751-793
- [12] 郑光植, 何静波, 王世林. 三分三愈伤组织及其悬浮细胞的冰冻贮藏. 植物学报, 1983, 25(6): 513-517
Zheng G Z, He J B, Wang S L. Frozen storage of thirds of callus and its suspension cells. Journal of Integrative Plant Biology, 1983, 25(6): 513-517
- [13] Rall W F, Fahy G M. Vitrification: A new approach to embryo cryopreservation. Theriogenology, 1985, 23(1): 220-220
- [14] 孙嘉莹, 李红阳, 李一琅, 冯晓峰, 丁志山. 药用植物超低温保存研究进展. 药物生物技术, 2019, 26(1): 60-63
Sun J Y, Li H Y, Li Y L, Feng X F, Ding Z S. Research progress on ultra-low temperature preservation of medicinal plants. Pharmaceutical Biotechnology, 2019, 26(1): 60-63
- [15] 朱东姿, 宗晓娟, 陈新, 王甲威, 徐丽, 魏海蓉, 谭钺, 刘庆忠. 甜樱桃砧木吉塞拉离体茎尖玻璃化法超低温保存研究. 山东农业科学, 2016, 48(10): 134-139, 144
Zhu D Z, Zong X J, Chen X, Wang J W, Xu L, Wei H R, Tan Y, Liu Q Z. Cryopreservation of *in vitro* shoot tips of sweet cherry rootstock Gisela by vitrification. Shandong Agricultural Sciences, 2016, 48(10): 134-139, 144
- [16] 梁杉, 张志东, 刘海广, 陈丽, 李亚东, 李金英. 蓝果忍冬离体茎尖小滴玻璃化超低温保存体系优化. 吉林农业大学学报, 2022, DOI: 10.27163/d.cnki.gjlnu.2021.000252
Liang S, Zhang Z D, Liu H G, Chen L, Li Y D, Li J Y. Optimization of cryopreservation system of shoot tips *in vitro* of blue honeysuckle (*Lonicera* L. subsect. *Caeruleae*) by droplet vitrification. Journal of Jilin Agricultural University, 2022, DOI: 10.27163/d.cnki.gjlnu.2021.000252
- [17] 张延红, 高素芳, 郭清毅, 陈红刚, 王惠珍, 曾翠云, 何春雨. 党参休眠芽玻璃化超低温保存及植株再生. 时珍国医国药, 2020, 31(7): 1714-1717
Zhang Y H, Gao S F, Guo Q Y, Chen H G, Wang H Z, Zeng C Y, He C Y. Cryopreservation and plantlet regeneration of dormant buds of *codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. by vitrification. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2020, 31(7): 1714-1717
- [18] 李伦政, 古丽娜尔·艾拜都拉, 杨瑞思, 周静, 陈全家, 曲延英, 张霞. 小滴玻璃化法超低温保存海岛棉 XH33 胚性细胞的研究. 农业生物技术学报, 2019, 27(7): 1199-1205
Li L Z, Gulinaer A B D L, Yang R S, Zhou J, Chen Q J, Qu Y Y, Zhang X. Study on cryopreservation of XH33 embryogenic cells in *Gossypium barbadense* by droplet vitrification. Journal of Agricultural Biotechnology, 2019, 27(7): 1199-1205
- [19] 李天菲, 林田, 滕小英, 周丽, 韩静, 刘鸿艳, 罗利军. 水稻愈伤组织超低温保存体系的建立. 植物遗传资源学报, 2021, 22(5): 1219-1227
Li T F, Lin T, Teng X Y, Zhou L, Han J, Liu H Y, Luo L J. Establishment of rice embryonic callus cryopreservation system. Journal of Plant Genetic Resources, 2021, 22(5): 1219-1227
- [20] 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
- [21] 刘艳萍, 朱中原, 刘涛阳. 超低温保存对胡杨种子活力及生理指标的影响研究. 南方农业, 2020, 14(14): 133-136, 139
Liu Y P, Zhu Z Y, Liu T Y. Effects of ultra-low temperature preservation on seed vigor and physiological indexes of *Populus euphratica*. South China Agriculture, 2020, 14(14): 133-136, 139
- [22] 张晓宁, 黄宁, 覃子海, 姚瑞玲, 杨红, 刘海龙. 无菌马尾松种子超低温保存技术研究. 广西植物, 2020, 40(7): 935-943
Zhang X N, Huang N, Tan Z M, Yao R L, Yang H, Liu H L. Cryopreservation of sterile *Pinus massoniana* seeds. Guihaia, 2020, 40(7): 935-943
- [23] 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
- [24] 顾雅坤, 吴怡, 符丽, 郑希龙, 曾琳, 魏建和. 九里香种子超低温保存研究. 植物遗传资源学报, 2020, 21(3): 760-766
Gu Y K, Wu Y, Fu L, Zheng X L, Zeng L, Wei J H. Study on cryopreservation of *Murraya exotica* L. seeds. Journal of Plant Genetic Resources, 2020, 21(3): 760-766