

干燥对 2 种栗属 (*Castanea*) 种子发芽率及水分状态的影响

亢涵, 龚治宇, 梁赋, 覃潜, 陆毕懿, 刘宝林
(上海理工大学 健康科学与工程学院, 上海 200093)

摘要: **目的** 探究栗属种子的脱水敏感性, 并研究干燥过程对胚轴水分状态的影响。**方法** 以产自河南的野生板栗和茅栗为实验材料, 室温下在密闭容器中用硅胶快速干燥 2 种新鲜栗子, 分别测定其干燥不同时间后水分含量和发芽率的变化并剥取胚轴。基于差式扫描量热技术 (DSC), 分析所取胚轴的热力学特征, 并根据胚轴含水量和对应热焓值计算可冻结水与非冻结水的占比。**结果** 板栗干燥 8 d 时, 水分含量由 49.51% 降至 32.97%, 发芽率从 78.33% 降至 8.5%; 茅栗干燥 4 d 时, 水分含量由 41.24% 降至 30.82%, 发芽率从 71.65% 降至 9.33%。种子水分含量低于 30% 时仅有少数种子发芽。DSC 分析显示, 实验过程中随着干燥时长的增加, 胚轴的水分含量显著下降且与结晶/熔融阶段的起始温度、峰值温度和热焓值呈显著正相关。板栗的可冻结水分含量由 89% 降至 7.9%, 茅栗的可冻结水分含量由 81% 降至 2.7%。**结论** 野生板栗和茅栗有极强的干燥敏感性, 属典型顽拗性种子, 其发芽率受水分含量高度影响, 其胚轴的热物性参数和水分状态也与干燥程度密切相关。

关键词: 栗属; 顽拗性种子; 干燥敏感性; 热力学分析; 水分状态

中图分类号: S375 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3563(2023)07-0096-08

DOI: 10.19554/j.cnki.1001-3563.2023.07.011

Effect of Drying on Germination and Moisture State of Two Species of Chestnuts (*Castanea*)

KANG Han, GONG Zhi-yu, LIANG Fu, QIN Qian, LU Bi-yi, LIU Bao-lin

(School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

ABSTRACT: The work aims to investigate the desiccation sensitivity of chestnut (*castanea*) seeds and study the effect of drying process on the moisture state of the embryonic axis. Samples were wild chestnuts of *castanea mollossoma* and *castanea sequinii* harvested in Henan Province. Two species of fresh chestnuts were rapidly dried with silica gel in airtight containers at room temperature and the moisture content (MC) and the germination were determined after different drying duration. Then, the embryonic axis was peeled off. Based on differential scanning calorimetry (DSC), the thermodynamic characteristics of the embryonic axis were analyzed. Afterward, the proportions of freezable water and non-freezable water were calculated as per MC and corresponding enthalpy of the embryonic axis. MC of *C. mollossoma* decreased from 49.51% to 32.97% after 8 days of drying, with a dropdown of germination from 78.33% to 8.5%. On the other hand, a smooth descent in MC of *C. sequinii* was reflected from 41.24% to 30.82% after 4 days of drying, with a similar curve of germination falling from 71.65% to 9.33%. Only a few seeds germinated when the MC was lower than 30%. According to the analysis of DSC, as drying duration prolonged, the MC of embryonic axis kept decreasing significantly and was positively correlated with onset temperature, peak temperature, and enthalpy of crystallization/melting stage. The proportion of

收稿日期: 2022-10-21

基金项目: 国家自然科学基金 (31750110474, 32001119)

作者简介: 亢涵 (1993—), 女, 博士生, 主要研究方向为顽拗性种质资源低温保存。

通信作者: 刘宝林 (1968—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为低温生物医学和食品冷冻冷藏。

freezable moisture in embryonic axis substantially reduced from 89% to 7.9% in *C. mollossoma* and an analogous trend happened in *C. sequinii* from 81% to 2.7%. Both *C. mollossoma* and *C. sequinii* of wild chestnuts are obviously-changeable on desiccation sensitivity. They are also typically recalcitrant seeds with germination rate highly affected by MC. Besides, the thermophysical parameters and moisture state of embryonic axis are also closely related to the degree of drying.

KEY WORDS: *castanea*; recalcitrant seeds; desiccation sensitivity; thermodynamic analysis; moisture state

栗属 (*Castanea* spp.) 为壳斗科 (*Fagaceae*) 植物, 是一种重要的经济作物, 自然分布在北半球温带和亚热带地区^[1]。栗属植物广泛应用于木材和坚果生产, 还有助于提高土壤质量、减少大气碳损失, 具有经济和生态双重效益^[2]。板栗 (*C. mollossoma*) 原产于中国, 分布在河北、山东、湖南、福建等诸多地区, 被作为经济果树大范围栽培^[3]。茅栗 (*C. sequinii*) 是中国特有种, 多分布于秦岭、淮河以南区域, 多处于野生状态^[4]。

顽拗性种子 (Recalcitrant Seed) 是木本植物种子的重要组成部分, 至少占植物种子的 8%, 占热带和亚热带种子的 18%^[5]。它们一般体积较大, 成熟脱落时依然保留较高的水分含量。为了快速萌发以适应环境, 顽拗性种子丧失了部分可激活保护体系的调节机制^[6], 因而较于正统性, 顽拗性种子的保存和繁殖都更为困难。散布时的高代谢活性使得顽拗性种子对环境胁迫 (如干燥、冷冻等) 十分敏感, 部分种子轻度脱水至含水量 20%~30% 时即丧失萌发活力^[7-8]。顽拗性种子的高代谢活性使其在室温环境无法长期保存, 高水分含量使得 0℃ 以下的保存造成死亡^[9]。这些性质使顽拗性种质的维护和遗传保护面临巨大挑战。

种子的萌发是胚轴生长扩展的过程^[10], 胚轴包含了种子的大部分遗传信息并具遗传稳定性^[11]。鉴于顽拗性种子长期保存的困难性和胚轴在萌发过程的重要性, 目前许多顽拗性种质资源的超低温保存依托于其胚或胚轴, 如七叶树^[12]、樱桃^[13]、鳄梨^[14]、橡胶^[15]等。与顽拗性种子相似, 其胚的干燥敏感性和冷冻损伤依旧是超低温保存的重大挑战。有研究显示快速干燥可以改善顽拗性种质的干燥敏感性, 如咖啡^[16]等, 但无法解决水分过度流失带来的代谢胁迫^[17]。此外, 由于冷冻过程中的冰晶损伤和溶质损伤, 提高干燥速率也无法完全解决低温保存后成活率不足的问题^[18], 所以水分含量和水分状态依然是顽拗性种质资源保存技术提升的关注点。

差示扫描量热法 (DSC) 是一种根据热力学和动力学特征的相关信息, 在微观尺度上鉴定样品热转变的方法^[19], 是记录种子组织热力学变化 (结晶、重结晶、熔化、多晶性等) 的有效工具^[20]。由于可溶性糖^[21]、氨基酸^[22]、抗冻蛋白^[23]等物质的积累, 许多种子内部水分不会发生完全结晶, 部分会保持未冻结状态。种子内的自由水 (可冻结水) 结晶会导致超低温贮藏时的冷冻损伤, 自由水若能减少到一定程度, 可以降低冷冻过程胞内冰损伤; 但束缚水 (非冻结水) 的移除则会降低种子的生存活力^[24]。DSC 可通过确定组织

中的冰量计算植物种子可冻结水和未冻结水含量, 为种质材料冷冻前的最佳干燥窗口提供参考。

作为我国重要的粮食树种, 栗属植株除板栗外多为野生状态, 这与其贮藏能力不足存在显著关联。目前国内对栗属种子的研究多集中于食用工艺, 对其贮藏相关的种子特性仍需深入探究。关于栗子保存, 民间多采用沙藏法、架藏法等, 部分企业会使用小型冷藏设备^[25]。但受制于对栗子临界含水量、贮藏温度等参数了解不足, 纵使冷藏能够保鲜以做食用, 但其萌发活力的维护依然不足。目前, 已有针对栗属种质资源低温保存的相关研究, 但对其干燥过程微观层面的水分状态的研究尚未深入。本研究将基于 DSC 技术, 探索栗子在干燥过程发芽率和水分状态的变化, 以期对栗属种质的低温长期保存提供参考。

1 实验

1.1 材料

主要材料: 板栗和茅栗采集于河南省洛阳市嵩县伏牛山, 是当地仅有的 2 个野生栗属品种。伏牛山海拔为 600~1 900 m, 地处亚热带、暖温带过渡地段, 属季风气候, 植被为暖温带落叶阔叶林向亚热带常绿阔叶林的过渡类型。树木栖息地分布于海拔 800~1 600 m, 花期为 4~6 月, 果期因品种而异, 集中在 8~10 月^[26]。

在自然传播期间 (2021 年 9 月 12 日) 从至少 8 棵健康数目中采集 2 种栗子各 2 000 粒。收集后对栗子进行目视检查并用聚乙烯袋包裹, 然后快递至上海理工大学。种子在收集后 3 d 内到达, 目测其是否完整后将完好种子浸入体积分数为 1% 的 NaClO 溶液中 15 min, 而后用蒸馏水漂洗 3 次, 期间去除漂浮的虫蛀粒和霉变粒。消毒后的栗子放置在垫有吸水无纺布的托盘上, 在 20℃ 恒温房间中静置 6 h 待表面水分蒸发。使用未密封的聚乙烯袋收集处理后的栗子并置于 4℃ 恒温环境中。后续的实验操作在上述处理后的 3 d 内开始。除特别说明, 后文提及的种子都为板栗和茅栗在自然界的繁殖单元 (Diaspore)。

主要仪器: SPX-150-GB 智能性光照培养箱, 上海跃进医疗器械有限公司; 101-00BS 电热鼓风干燥机, 上海宏诺设备有限公司; BD/BC-241WE 冰箱, 美的集团股份有限公司合肥分公司; FA2204B 精密电子天平, 上海越平科学仪器有限公司; Quintix35-1CN

分析天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;D3300 数码单镜反光照相机,尼康映像仪器销售(中国)有限公司;差式扫描量热仪,铂金埃尔默仪器(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 种子基本特征

各个物种随机选取 50 粒种子,用游标卡尺测量单粒种子的横径、纵径和高径。百粒质量的称量使用电子天平(0.000 1 g),每次随机选取 100 粒种子,记录称量,重复 5 次。水分含量的测定遵循 ISTA (2020) 描述方法:以鲜质量为基础,分析天平测量每个物种 15 个新鲜种子(或相应组织)的 3 个重复质量,在 103 °C 的标准烘箱中干燥 17 h,然后测量干质量,数值根据鲜质量和干质量之间的差异计算(若无特殊说明,水分含量均以鲜质量计)。发芽过程在 20、25 °C 下光照(光合光子通量为 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,由冷白荧光灯管提供),以 10、14 h 为周期的培养箱中进行。发芽定义为种胚伸长至少 2 mm,且后期持续观察胚根伸长至少 10 mm,以确保胚根突出不是由于下胚轴的机械伸长。

1.2.2 快速干燥过程种子水分含量和活力的变化

各物种随机选择 170×4 个种子,在室温(23 ± 2)°C 下置于装有硅胶(种子与二氧化硅的质量比为 1:5)的密封容器内干燥,2 个物种分别进行 4、8、12、16 d(板栗)和 2、4、6、8 d(茅栗)的干燥处理。实验期间若硅胶颜色变化则及时予以更换。干燥相应天数后对 15 个种子进行 3 次重复试验(3×5)以确定水分含量(ISTA 2020);60 个种子作为 4 个重复样本(4×15)以评估发芽能力。

1.2.3 胚轴热力学分析和水分含量测定

对上述干燥时长不同的胚轴进行热力学测定,以液氮制冷,测试前用标准物质锌和纯水对仪器冷冻过程进行标定。DSC 的测定参照 Al-Zoubi 等的方法^[27],将样品放入 PE DSC 专用铝制样品皿,待样品皿盖好后压制,并在分析天平(0.000 01 g)上称取样品质量;温度程序设定:20 °C 保持 1 min,以 10 °C/min 降温至 -100 °C 后保持 1 min,再以 10 °C/min 升温至 20 °C,每种样品 3 次重复。以 45 个种胚进行 3 次重复试验(3×15)来确定胚轴水分含量(ISTA, 2020)。

1.2.4 可冻结水分与非冻结水分测定

热力学分析结束后刺穿样品皿,使用热烘干法(ISTA, 2020)测量样品干质量。计算内容包括样品的含水量、可冻结水分含量及非冻结水分含量,3 组重复,计算方法^[28]如下:

含水量=

$$\frac{\text{烘干前胚轴质量}-\text{烘干后胚轴质量}}{\text{烘干后胚轴质量}}\times 100\% \quad (1)$$

可冻结水分含量=

$$\frac{\text{升温过程冰晶熔融峰值面积}}{334.5}\times 100\% \quad (2)$$

非冻结水分含量=含水量-可冻结水分含量 (3)

其中,峰值面积单位为 mJ/mg。

1.3 数据处理

数据记录及作图由 Origin 9.1 完成。单因素 ANOVA 分析和 LSD 两两比较由 SPSS Statistics 19 处理(95%置信度)。热力学曲线数据由 DSC Pyris series 分析。所有数值以平均值 $\pm$ 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 种子的基本特征

如表 1 所示,板栗和茅栗的形状相近,大小差异较大,同等粒数下板栗质量约为茅栗的 3.5 倍,板栗的长径、短径和高径约为茅栗的 1.5 倍。成熟脱落的果实、种胚和子叶之间的水分含量没有显著差异,但种子不同部位的水分含量存在差异,其中以种胚的水分含量最高,在 57% 以上。在适宜的光照和温度下,2 种种子都快速发芽(7 d 内),并在 3 个月内完成发芽。与茅栗相比,板栗的发芽周期更短。

2.2 干燥过程对发芽率的影响

由图 1 可知,种子水分含量均随着干燥时间的增加而降低,两者相比茅栗的干燥速率更快。随着水分的流失,种子的发芽率也显著下降。板栗和茅栗的初始发芽率分别为 78.33% 和 71.65%,第 1 阶段干燥后板栗(4 d)和茅栗(2 d)的水分含量分别为 36.87% 和 35.94%,此时的发芽率分别为 45.35% 和 41.33%;第 2 阶段干燥后板栗(8 d)和茅栗(4 d)的水分含量分别为 32.97% 和 30.82%,此时的发芽率分别降至 8.5% 和 9.33%。此阶段后的干燥仅对水分含量影响较大,对发芽率的影响不再显著。

2.3 干燥过程胚轴的热物性分析

DSC 热分析(图 2)显示随着干燥时间增加,胚轴的水分含量显著降低,且胚轴热流曲线的峰值面积随着水分含量的降低而减小。胚轴热力学特征值见表 2,板栗和茅栗胚轴的水分结晶的起始温度为 -7 ~ -35 °C,水分熔融的起始温度为 -2 ~ -30 °C,均在 0 °C 以下。当胚轴水分含量低于 15% 时,在降温过程未形成较大结晶。冷却结晶阶段和升温熔融阶段的起始温度、峰值温度和热焓值都随胚轴水分含量的降低呈规律性下降。以升温阶段为例,板栗的起始温度、峰值温度和热焓值与胚轴水分含量的相关系数分别为 $r_1=0.98$ 、 $r_2=0.87$ 、 $r_3=0.99$;茅栗的的起始温度、峰值温度和热焓值与胚轴水分含量相关系数分别为 $r_1=0.89$ 、 $r_2=0.95$ 、 $r_3=0.99$,均呈现显著正相关。

表 1 板栗和茅栗种子的形态学特征
Tab.1 Morphological characteristics of seeds of *C. mollossoma* and *C. sequinii*

物种名称	坚果形态	横径/mm	纵径/mm	高径/mm	百粒质量/g	种子水分含量/%	种胚水分含量/%	子叶水分含量/%	首次发芽时间/d	最后发芽时间/d
板栗	扁圆形	32.6±2.8 ^a	22.3±4.3 ^a	28.7±2.9 ^a	796±12 ^a	49.51±1.94 ^a	62.76±2.04 ^a	56.80±1.75 ^a	2	41
茅栗	扁圆形	19.4±1.5 ^b	12.5±1.7 ^b	19.9±1.2 ^b	225±17 ^b	41.24±4.95 ^a	57.03±3.90 ^a	52.65±2.90 ^a	7	73

注：不同字母代表差异显著，显著性水平为 0.05。

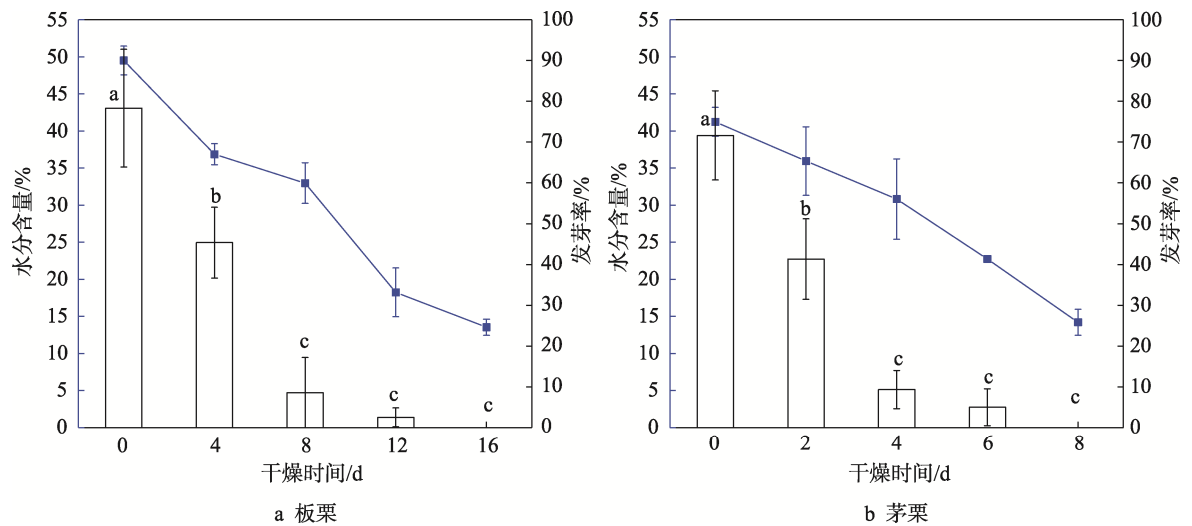


图 1 不同干燥时长下板栗和茅栗种子水分含量和发芽率的变化
Fig.1 Moisture content and germination of *C. mollossoma* and *C. sequinii* seeds for different drying time

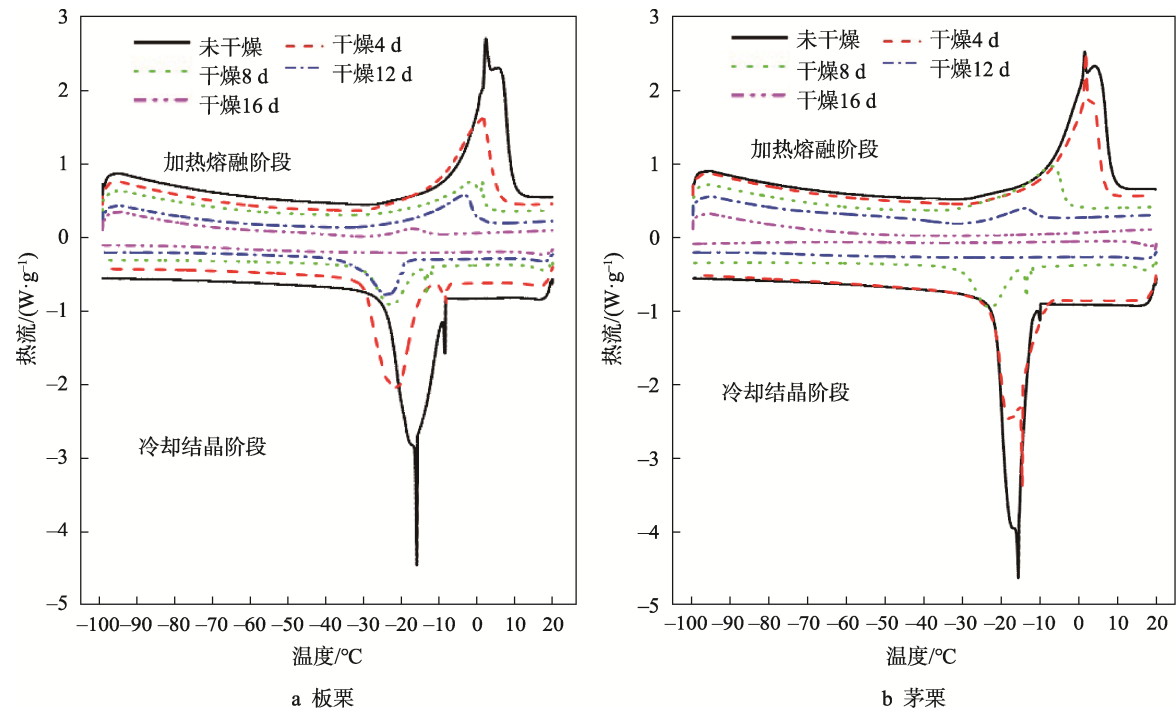


图 2 不同干燥时长下板栗和茅栗种子胚轴热分析
Fig.2 Thermograms of the embryonic axes of *C. mollossoma* and *C. sequinii* seeds for different drying time

2.4 可冻结与非冻结水分的比较

胚轴可冻水分与非冻结水分的比较见图 3，随着种子干燥程度的增大，板栗和茅栗的胚轴的非冻结水的比例显著增加。未干燥时胚轴中的水分多以可

冻结状态存在，干燥结束后胚轴的水分多以非冻结状态存在。干燥过程中，板栗的可冻结水分比例由 89% 降至 7.9%，茅栗的可冻结水分由 81% 降至 2.7%。与之相对，非冻结水分的比例逐渐上升。尽管干燥过程持续了较长时间，但实验过程中可冻结水分未完全消失。

表 2 不同干燥时长下板栗和茅栗种子胚轴热力学特征
Tab.2 Thermodynamic characteristics of the embryonic axes of *C. mollossoma* and *C. sequinii* seeds for different drying time

物种名称	干燥时间/d	胚轴水分含量/%	冷却结晶阶段			加热熔融阶段		
			起始温度/℃	峰值温度/℃	热焓（干质量）/(J·g ⁻¹)	起始温度/℃	峰值温度/℃	热焓（干质量）/(J·g ⁻¹)
板栗	0	64.68±2.17 ^a	-7.47±0.73 ^a	-13.63±3.11 ^a	-164.81±9.81 ^a	-2.49±0.23 ^a	1.89±0.31 ^a	162.65±4.09 ^a
	4	51.99±1.27 ^b	-7.82±0.96 ^a	-20.07±0.81 ^b	-100.90±15.31 ^b	-10.46±2.83 ^b	1.16±0.33 ^a	105.41±14.90 ^b
	8	35.78±11.09 ^c	-17.92±1.19 ^b	-23.71±1.05 ^b	-66.97±13.61 ^b	-12.76±1.79 ^b	-2.42±1.06 ^b	69.01±11.42 ^c
	12	20.02±8.51 ^d	-22.00±1.13 ^c	-26.32±10.01 ^{bc}	-16.45±1.82 ^c	-22.90±2.98 ^c	-6.38±2.61 ^c	31.68±9.35 ^d
	16	13.14±2.07 ^d	-37.19±3.54 ^d	-41.09±4.78 ^c	-6.03±3.77 ^d	-24.15±4.22 ^c	-17.23±3.86 ^d	7.60±3.01 ^e
茅栗	0	55.16±2.89 ^a	-9.33±2.78 ^a	-15.30±1.70 ^a	-125.99±5.79 ^a	-9.79±1.34 ^a	3.73±0.15 ^a	128.20±8.20 ^a
	2	40.31±5.53 ^b	-18.71±1.59 ^b	-20.65±6.82 ^{ab}	-70.73±2.90 ^b	-10.66±1.54 ^a	1.12±0.81 ^b	74.39±10.77 ^b
	4	30.62±7.69 ^c	-18.37±5.02 ^b	-24.50±1.65 ^b	-27.23±5.53 ^c	-13.49±3.78 ^a	-4.17±3.95 ^c	35.87±7.37 ^c
	6	23.29±7.58 ^{cd}	-29.03±4.88 ^c	-40.40±2.50 ^c	-9.57±3.77 ^d	-24.06±5.70 ^b	-9.83±0.94 ^{cd}	20.27±3.67 ^d
	8	15.60±3.92 ^d	-34.17±3.08 ^c	-44.10±2.45 ^c	-1.45±0.39 ^e	-29.35±1.81 ^b	-16.83±5.29 ^d	3.87±0.25 ^e

注：不同字母代表差异显著，显著性水平为 0.05。

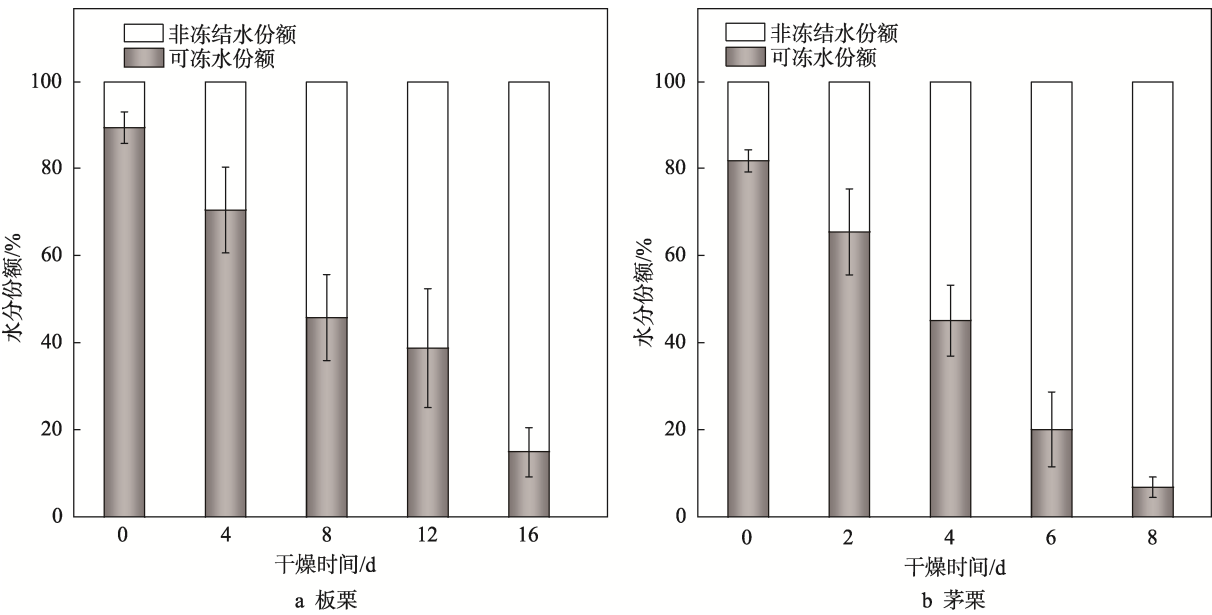


图 3 不同干燥时长下板栗和茅栗种子胚轴可冻结水与非冻结水占比
Fig.3 Ratio of freezable water to non-freeze water in embryonic axes of *C. mollossoma* and *C. sequinii* seeds for different drying time

3 讨论

种子的初始发芽时间均在1周以内且在3个月完成发芽过程,说明种子并没有产生休眠,这与Sundaram等^[29]的研究并不一致。这可能与种子所处生境相关,实验采集栗子的自然散布时间与伏牛山的大量降雨时段有部分重叠,植物将发芽时间与利于生长的季节同步,可分散干燥带来的风险^[30]。与大多数顽拗性种子相同,即使在脱落和运输过程中可能经历了轻微的干燥,2种栗子的初始水分含量仍在40%以上^[17]。伴随着高水分含量,干燥敏感性也是顽拗性种子的普遍性状^[31]。现有几种形态特征可用于判断种子的干燥敏感性:种子大小、形状、质量等。Hong等^[32]的研究显示种子越大且形态近圆则顽拗性的可能性较大;种子的千粒质量超过1300g(即百粒质量>130g)的物种就可能有干燥敏感特质^[33]。2种栗子的数据结果与这些结论均一致,形态较大(较正常性),百粒质量均大于130g,形状为扁形。此外,内部水分评估显示种子胚的水分含量高于50%。这一结果与来自中国的其他栗子水分含量一致^[34],表明栗子在整个生态系统中的相似性。

干燥实验表明,栗子在水分流失的过程中发芽率不断下降。与对照(干燥0d)相比,干燥2d(茅栗)或4d(板栗)即可使发芽率显著下降,但2种种子的干燥速率存在一定差异,干燥初期茅栗的干燥速率高于板栗的。这种差异与形态大小和初始水分含量这2个因素有关。在对橡子的研究发现,同等条件下体积较大种子的干燥速率小于体积较小种子的^[35]。尽管如此,当水分含量下降到30%时,2种栗子的发芽率均不到10%;而超过12d的干燥对2个物种都是致命的。水分胁迫导致的代谢失衡,会严重干扰包括种子萌发在内的多种生理过程。目前,已知顽拗性种子的临界(致死)水分含量为12%~31%^[36],实验种子的临界水分含量为30%~35%。

种子在干燥过程中,种胚是水分含量最高的组织,胚轴的水分含量会高出完整种子13.25%到15.79%不等。这种现象在其他种子,如锥栗^[37]、糖棕^[38]、黄檀^[39]等同样存在。虽然胚轴是种子重要的分生组织,但顽拗性种子的其他结构,如胚乳、果皮等组织占种子质量的绝大部分。所以用完整种子的水分含量评估胚轴的水分含量时会导致一定的误差。DSC的热物性数据表明,水分冻结或熔融温度与胚轴的水分含量存在显著关系,而低于冰点的冻结温度与低温损伤之间存在巨大关联^[24]。植物种质资源低温保存的关键是在保证细胞活性和细胞膜完整性的前提下降低可冻水含量,前者与干燥过程紧密相关^[37],后者对冰晶的形成至关重要^[34]。

根据Buitink等^[40]研究发现,种子组织在干燥至玻璃化转变温度后可提高低温保存成活概率。实验材

料分别干燥至最低水分含量为13.14%(板栗)和15.60%(茅栗)时,DSC曲线未发现玻璃化转变。若要获得理想的玻璃化转变可能需要更低的含水量,但根据干燥实验可知,种子干燥至30%以下后就可能在脱水阶段失活,冷冻保存需在此含水量附近通过其他方法(冷冻保护剂^[5]、培养基优化^[13]、蔗糖渗透脱水^[41]等)提升植物种质存活率,而非继续干燥。此外,虽然伴随着干燥过程的进行,胚轴的水分含量在显著下降,其中茅栗的可冻结水分含量更低,但可冻结水依然存在于整个干燥过程。这意味着即使干燥至较低的水分含量,在低温冷冻过程中依然有结晶,尤其在平均水分含量高于种子的胚轴中。因此,在未来种胚或胚轴的保存过程中,可以借鉴可冻水的变化进一步优化冷冻操作和步骤,如挑选合适的成熟日期^[42],干燥至适当的水分含量^[38]、选择合适的预冷温度^[43]等提升栗子胚轴的超低温适应性。

4 结语

了解种子干燥过程活力及水分的变化对优化种质资源保存策略,尤其是超低温保存方案的制定都十分重要。与大部分顽拗性种子相似,2种栗子散布时体积较大且水分含量很高,在40%以上,其胚轴的初始水分含量在57%以上,有很强的干燥敏感性,种子的临界水分含量为30%~35%。热物性分析发现,2种栗子胚轴的表现相似,其冻结/熔融温度、峰值温度和热焓值与其干燥程度密切相关,而可冻水存在于整个干燥过程中。这对栗子超低温保存过程中的冷冻损伤做出了部分解释,同时也为栗属在内的顽拗性种质资源的不易保存且解冻后不易存活等问题提供了佐证。本实验证明了栗属种子的干燥敏感性和低温敏感性,为后期种子的超低温保存提供了一定的参考。

参考文献:

- [1] SHI Ling-ling, WANG Jia, LIU Yu-jun, et al. Transcriptome Analysis of Genes Involved in Starch Biosynthesis in Developing Chinese Chestnut (*Castanea Mollissima* Blume) Seed Kernels[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 3570.
- [2] PAPAIOANNOU E, KOSTOPOULOU S, STEFANO S. The Effect of the Conversion of Chestnut (*Castanea Sativa* Mill.) Forests to Orchards on Soil Fertility and Nutrient Content in Leaves [J]. Catena, 2022, 211: 105948.
- [3] HUANG Yuan-yuan, ZHAO Ren-bang, LIU Wei-hua, et al. Using Pretreated Chestnut Endothelium to Adsorb Lead and Cadmium Ions from Water[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2018, 25(6): 1154-1162.

- [4] 黄宏文. 从世界栗属植物研究的现状看中国栗属资源保护的重要性[J]. 武汉植物学研究, 1998, 16(2): 171-176.
HUANG Hong-wen. Review of Current Research of the World Castanea Species and Importance of Germplasm Conservation of China Native Castanea Species[J]. Plant Science Journal, 1998, 16(2): 171-176.
- [5] BREMAN E, BALLESTEROS D, CASTILLO-LORENZO E, et al. Plant Diversity Conservation Challenges and Prospects-the Perspective of Botanic Gardens and the Millennium Seed Bank[J]. Plants (Basel, Switzerland), 2021, 10(11): 2371.
- [6] WOJCIECHOWSKA N, ALIPOUR S, STOLARSKA E, et al. Peptide-Bound Methionine Sulfoxide (MetO) Levels and MsrB2 Abundance are Differentially Regulated during the Desiccation Phase in Contrasted *Acer* Seeds[J]. Antioxidants (Basel, Switzerland), 2020, 9(5): 391.
- [7] ANGUELOVA-MERHAR V S, CALISTRU C, BERJAK P. A Study of some Biochemical and Histopathological Responses of Wet-Stored Recalcitrant Seeds of *Avicennia Marina* Infected by *Fusarium Moniliforme*[J]. Annals of Botany, 2003, 92(3): 401-408.
- [8] MAZLAN O, AIZAT W M, BAHARUM S N, et al. Metabolomics Analysis of Developing *Garcinia Mangostana* Seed Reveals Modulated Levels of Sugars, Organic Acids and Phenylpropanoid Compounds [J]. Scientia Horticulturae, 2018, 233: 323-330.
- [9] NORMAH M N, SULONG N, REED B M. Cryopreservation of Shoot Tips of Recalcitrant and Tropical Species: Advances and Strategies[J]. Cryobiology, 2019, 87: 1-14.
- [10] MONTECHIARINI N H, MORANDI E N, GOSPARINI C O. Developing Soybean Seed Germination: Low Aba and High Exp1 Gene Expression Promote Embryonic Axis Growth Whereas the Seed Coat Delays Radicle Protrusion[J]. Seed Science Research, 2022, 32(1): 23-33.
- [11] JUAREZ-ESCOBAR J, GUERRERO-ANALCO J A, ZAMORA-BRISÑO J A, et al. Tissue-Specific Proteome Characterization of Avocado Seed during Postharvest Shelf Life[J]. Journal of Proteomics, 2021, 235: 104112.
- [12] ZDRAVKOVIĆ-KORAĆ S, MILOJEVIĆ J, BELIĆ M, et al. Tissue Culture Response of Ornamental and Medicinal *Aesculus* Species-a Review[J]. Plants (Basel, Switzerland), 2022, 11(3): 277.
- [13] SRIVASTAVA V, HAJONG S, CHANDORA R, et al. Desiccation and Freezing Tolerance of Recalcitrant Seeds and Embryonic Axes of *Prunus Napaulensis* (Ser.) Steud.: A Crop Wild Relative of Cherry[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2022, 69(4): 1571-1583.
- [14] O'BRIEN C, HITI-BANDARALAGE J, FOLGADO R, et al. Cryopreservation of Woody Crops: The Avocado Case[J]. Plants (Basel, Switzerland), 2021, 10(5): 934.
- [15] CARVALHO T C, AYUB R A, GONCALVES E C P, et al. Cryopreservation of Zygotic Embryos of Syringe (*Hevea Brasiliensis*) Containing Reserve Fabric[J]. Ciencia Florestal, 2021, 31(2): 959-973.
- [16] FIGUEIREDO M A, ROSA S, RICALDONI M A, et al. Physiological, Biochemical, and Ultrastructural Aspects of *Coffea Arabica* L. Seeds under Different Cryopreservation Protocols[J]. Ciência e Agrotecnologia, 2021, 45(4): 1-14.
- [17] CHMIELARZ P, SUSZKA J, WAWRZY尼亚K M K. Desiccation Does Not Increase Frost Resistance of Pendunculate Oak (*Quercus Robur* L.) Seeds[J]. Annals of Forest Science, 2022, 79(3): 1-12.
- [18] STRECYNSKI R, CLARK H, WHELEHAN L M, et al. Current Issues in Plant Cryopreservation and Importance for Ex Situ Conservation of Threatened Australian Native Species[J]. Australian Journal of Botany, 2019, 67(1): 1-15.
- [19] WIRKOWSKA-WOJDYLA M, OSTROWSKA-LIGEZA E, GORSKA A, et al. Application of Chromatographic and Thermal Methods to Study Fatty Acids Composition and Positional Distribution, Oxidation Kinetic Parameters and Melting Profile as Important Factors Characterizing Amaranth and Quinoa Oils[J]. Applied Sciences-Basel, 2022, 12(4): 1-12.
- [20] ORJUELA-PALACIO J M, GRAIVER N, SANTOS M V, et al. Effect of the Desiccation Tolerance and Cryopreservation Methods on the Viability of Citrus Limon L. Burm Cv. Eureka Seeds[J]. Cryobiology, 2019, 89: 51-59.
- [21] FENG M C, YU Q, CHEN Y, et al. Scmt10, a Metallothionein-Like Gene from Sugarcane, Enhances Freezing Tolerance in *Nicotiana Tabacum* Transgenic Plants[J]. Environmental and Experimental Botany, 2022, 194: 1-13.
- [22] HENAO A, RUIZ G N, STEINKE N, et al. On the Microscopic Origin of the Cryoprotective Effect in Lysine Solutions[J]. Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP, 2020, 22(13): 6919-6927.
- [23] KASHYAP P, KUMAR S, SINGH D. Performance of Antifreeze Protein HrCHI4 from Hippophae Rham-

- noides in Improving the Structure and Freshness of Green Beans Upon Cryopreservation[J]. Food Chemistry, 2020, 320: 126599.
- [24] HAN B, LU L, GUO S J, et al. Desiccation Sensitivity of Wild *Castanea Mollissima* Blume Determined by Differential Scanning Calorimetry[J]. Bangladesh Journal of Botany, 2020, 49(4): 975-980.
- [25] 易善军. 我国板栗产业发展现状及策略[J]. 西部林业科学, 2017, 46(5): 132-134.
- YI Shan-jun. Situation and Development Strategy of Chestnut Industry in China[J]. Journal of West China Forestry Science, 2017, 46(5): 132-134.
- [26] 宋朝枢. 伏牛山自然保护区科学考察集[M]. 北京: 中国林业出版社, 1994: 74-94.
- SONG Chao-shu. Scientific Survey of the Funiushan Mountain National Nature Reserve[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1994: 74-94.
- [27] AL-ZOUBI O M, NORMAH M N. Critical Moisture Content for Successful Cryopreservation of Embryonic Axes of *Fortunella Polyandra* Determined by Differential Scanning Calorimetry (DSC)[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 37(1): 1721-1727.
- [28] BLOCK W. Water Status and Thermal Analysis of Alginic Beads Used in Cryopreservation of Plant Germplasm[J]. Cryobiology, 2003, 47(1): 59-72.
- [29] SUNDARAM M, HIGDON A E, WOOD K V, et al. Mechanisms Underlying Detection of Seed Dormancy by a Scatter-Hoarding Rodent[J]. Integrative Zoology, 2020, 15(2): 89-102.
- [30] JAGANATHAN G K. Ecological Insights into the Coexistence of Dormancy and Desiccation-Sensitivity in *Areaceae* Species [J]. Annals of Forest Science, 2021, 78(1): 1-14.
- [31] CARVALHO M B F, MOREIRA M F, MENDONÇA A P. Comportamento Fisiológico Das Sementes De *Cojoba Arborea* (L.) Britton & Rose Submetidas à Secagem X1-Physiological Behavior of *Cojoba Arborea* (L.) Britton & Rose Seeds Submitted to Drying[J]. Revista de Ciências Agrárias, 2021, 44(2/3): 51-60.
- [32] HONG T D, ELLIS R H. Ex Situ Biodiversity Conservation by Seed Storage: Multiple-Criteria Keys to Estimate Seed Storage Behaviour [J]. Seed Science and Technology, 1997, 25(1): 157-161.
- [33] HONG T D, ELLIS R H. Contrasting Seed Storage Behaviour among Different Species of *Meliaceae* [J]. Seed Science and Technology, 1998, 26(1): 77-95.
- [34] 韩彪, 李文清, 郭素娟, 等. 基于差示扫描量热技术的板栗胚轴低温保存技术及临界含水量[J]. 林业科学, 2020, 56(3): 21-27.
- HAN Biao, LI Wen-qing, GUO Su-juan, et al. Cryopreservation and Critical Moisture Content of Embryo Axis of *Castanea Mollissima* Based on Differential Scanning Calorimetry[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2020, 56(3): 21-27.
- [35] GANATSAS P, TSAKALDIMI M. A Comparative Study of Desiccation Responses of Seeds of Three Drought-Resistant Mediterranean Oaks[J]. Forest Ecology and Management, 2013, 305: 189-194.
- [36] ROBERTS E H. Loss of Viability: Ultrastructural and Physiological Aspects[J]. Seed Science and Technology, 1973, 1: 529-545.
- [37] LEPRINCE O, BUITINK J, HOEKSTRA F A. Axes and Cotyledons of Recalcitrant Seeds of *Castanea Sativa* Mill. Exhibit Contrasting Responses of Respiration to Drying in Relation to Desiccation Sensitivity[J]. Journal of Experimental Botany, 1999, 50(338): 1515-1524.
- [38] HAN K, JAGANATHAN G K, HE L, et al. Cryopreservation of *Borassus Flabellifer* L. (Arecaceae) Using Excised Embryos: A First Report for the Genus *Borassus*[J]. Cryo Letters, 2021, 42(5): 267-271.
- [39] ZENG Lin, HE Ming-jun, CHEN Kui, et al. Cryopreservation Study on Seeds and Embryos in *Dalbergia Odorifera*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2014, 39(12): 2263-2266.
- [40] BUITINK J, LEPRINCE O. Glass Formation in Plant Anhydrobiotes: Survival in the Dry State[J]. Cryobiology, 2004, 48(3): 215-228.
- [41] KULUS D. Cryopreservation of Bleeding Heart (*Lamprocapnos Spectabilis* (L.) Fukuhara) Shoot Tips Using Encapsulation-Dehydration[J]. Cryo Letters, 2020, 41(2): 75-85.
- [42] 宗梅. 顽拗性板栗种子脱水耐性的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2005: 12-22.
- ZONG Mei. Study on Dehydration Tolerance of Stubborn Chestnut Seeds[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2005: 12-22.
- [43] ÁLVAREZ J M, CORTIZO M, ORDÁS R J. Cryopreservation of Somatic Embryogenic Cultures of *Pinus Pinaster*: Effects on Regrowth and Embryo Maturation[J]. Cryo Letters, 2012, 33(6): 476-484.