

潘丽梅,付金娥,万凌云,等.植物顽拗性种子保存及脱水、低温敏感性研究进展[J].江苏农业科学,2021,49(4):1-7.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.04.001

植物顽拗性种子保存及脱水、低温敏感性研究进展

潘丽梅,付金娥,万凌云,宋利沙,韦树根

(广西壮族自治区药用植物园,广西南宁 530023)

摘要:分析国内外近 10 年来顽拗性种子研究的最新概况,并对其保存技术及脱水、低温敏感性的生理生化机制和分子机制等方面进行综述。种子保存方面,主要是集中在低温保存与超低温保存技术及其保存过程中细胞结构变化的研究,保存成功案例较少;脱水及低温敏感性方面,生理生化的研究主要集中在可溶性糖、可溶性蛋白及酶等变化的研究,不同的植物在其脱水或低温过程中有各自的变化特点。顽拗性种子脱水与低温致死是一个复杂的生理生化及内部基因变化过程,其机制尚未完全清楚,从转录组学、蛋白质组学等多组学进行联合分析,可为顽拗性种子的保存与繁育提供理论基础,也将为顽拗性种子的脱水修复机制提供理论依据。

关键词:顽拗性种子;保存;脱水敏感性;低温敏感性;分子机制

中图分类号: S184 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)04-0001-07

全球 452 个科的 39.2 万种维管束植物中有 428 个科的 95% 种是种子植物,种子植物是地球上最成功的现存陆地植物^[1],而种子保存是种子植物长期保存以及后续利用的最理想方式^[2]。根据种子收获后的生理状况,可将种子划分为正常性种子(orthodox)、中间性种子(intermediate)和顽拗性种子(recalcitrant)三大类型^[3-4]。正常性种子在成熟过程中经历成熟脱水,能长期保存在低温条件下,且大部分可实现超低温保存;中间性种子则处于两者之间,可以干燥到一定程度,但干燥并不能延长种子寿命,对低温也存在一定程度的敏感性,难以在低温条件下长期保存;顽拗性种子则不耐脱水和低温,种子脱落后仍保持高含水量,因此仍代谢活跃,且在零度以下易遭受冰晶损伤,常温下一般仅能存放数天而已^[5]。通常处于热带、亚热带地区的一些木本植物,随着环境进化产生顽拗性种子,少

数温带植物也有顽拗性种子。顽拗性种子自发现以来一直是种子研究的热点与难点,国内外专家和学者做了大量的研究,而植物顽拗性种子在综述方面的报道甚少。因此,本文对顽拗性种子的保存、脱水及低温敏感性等方面进行综述。

1 保存技术研究

1.1 顽拗性种子的保存

正常性种子可以在干燥状态下存放较长时间,因此可以在低含水量和零度以下的低温成功保存;且正常性种子具有多种保护过程和机制以及脱水耐性,其中重要的是代谢关闭和细胞内去分化。相反,顽拗性种子不耐脱水且对低温敏感,常规的种子库无法实现长期保存。主要原因是顽拗性种子在保存期间不经历细胞内的去分化,且能继续维持代谢活性并进行新陈代谢活动。诸多学者认为超低温保存仍是长期保存顽拗性种子的唯一可行方法,但该方法并不容易实现,仍面临许多挑战,比如存在需要部分脱水以防止冰晶损伤、低温保存后如何恢复生长等问题^[6-7]。目前的报道中,低温保存获得成功的也只能以胚或胚芽进行保存,但重新发芽的成功率不高^[8];在高度顽拗性的长叶金柑(*Fortunella polyandra*)种子组织中,经冷冻和液氮保存后,其胚轴成活率就较低^[9-10]。部分研究也认为超低温保存是顽拗性种子的理想方式,但由于种子的顽拗性特质,这也成了植物种质资源超低温保存领域的重点和难点。要真正实现顽拗性种子的超

收稿日期:2020-05-19

基金项目:国家自然科学基金(编号:81960695、81860672、81703649、81660637、81403045);广西自然科学基金(编号:2018GXNSFAA281089、2017GXNSFDA198026、2016GXNSFDA380012、2014GXNSFBAI18204);广西药用植物园创新研究团队项目(编号:GYCH2019008);广西药用植物园科研基金(编号:桂药基 202012)。

作者简介:潘丽梅(1982—),女,广西藤县人,博士,高级工程师,主要从事药用植物栽培与遗传育种研究。E-mail: plimei2006@163.com。

通信作者:韦树根,博士,研究员,主要从事药用植物栽培与遗传育种研究。E-mail: weishugen2@163.com。

低温保存还需要开拓更多的研究^[11]。而要实现低温保存则要使材料尽快处于玻璃化状态^[12],如山凤果 (*Garcinia hombroniana*)、山竹 (*Garcinia mangostana*) 等利用玻璃化技术实现了茎尖的超低温保存^[13-14]。可见,要实现顽拗性种子的长期保存,材料处理至关重要。

超低温保存前需要进行部分脱水,但种子含水量又不能过低,Lan 等研究了见血封喉树种子的贮藏情况,表明种子的含水量越低,种子存活所需的贮藏温度越高,越不利于超低温保存^[15]。种子对脱水的反应取决于脱水速率,在高含水量下缓慢脱水会导致种子生活力丧失,如果冷却速度足够快,快速脱水的材料在短期内可以存活到足够低的水分含量以允许剩余细胞内水的玻璃化,而不是冰晶的形成。但顽拗性种子大部分个头较大,不利于玻璃化所需的脱水和冷却速率,因此最佳的保存部位是茎尖或者胚尖^[12]。蒲葵 (*Livistona chinensis*) 种子的种胚经超低温保存 2 年后仍有活力^[16-17],布迪椰子 (*Butia capitata*) 种子的种胚也能在液氮等超低温条件下保存一段时间^[18]。Al Zoubi 等利用差示扫描量热法 (DSC) 测定了长叶金柑 (*Fortunella polyandra*) 胚轴成功冷冻保存的临界含水量,并确定了其最佳含水量,经超低温保存后存活率为 50%^[19]。曾琳等分别对顽拗性益智种子、羯布罗香种子、降香种子进行超低温保存试验,表明这 3 种顽拗性种子超低温保存可行且安全可靠^[20-22]。不过,Wesley - Smith 等的研究表明胞内结冰并不是致命的,如果晶体较小且位于细胞质中,细胞则可以在细胞内结冰状态下存活,因此需要进一步了解含水量、冷却速率、细胞结构和冰结构之间的相互作用,以优化冷冻保存处理^[23]。超低温保存时,保存的过程以及保存后取出都极易伤害植物材料,因此对材料的选择和处理也有较高的要求。对于每种顽拗性种子,都需要去探索最佳的保存部位和保存方式,才能实现种子的超低温保存。

此外,顽拗性种子除了超低温保存外,其他保存方式也有报道。比如气调法、隔水浸泡法、充气吸涨法等适于短(中)期保存的方法,基本不损伤种子活力,并能尽量减少脱水以及虫害、微生物等的干扰,可实现顽拗性种子的暂时保存,特别是一些不适合超低温保存的顽拗性种子。笔者所在课题组的研究表明,桑寄生种子在 2 mg/L 的脱落酸 (ABA) 溶液中浸种 30 min,在 4 ℃ 条件下可有效延

缓种子生活力的丧失从而实现短期保存^[24-25]。竹柏种子、非洲马铃薯种子、茶树种子、黄连种子、北细辛种子、金丝李种子等也均可在 4 ℃ 条件下保存一段时间^[26-31]。Hathuru - Singha 等^[32]对红厚壳种子的保存进行研究认为,其不适合低温保存,但如果种子储存在温暖适宜和略微潮湿的环境中,而且不去除内果皮,则可以在相当长的时间内 (> 8 个月) 保持生活力。坡垒 (*Hopea hainanensis*) 顽拗性种子在 15 ℃ 或 20 ℃ 下贮藏 14 个月,发芽率为 87% ~ 91%^[33]。藤黄属的热带植物藤黄果 (*Garcinia gummi - gutta*) 种子在密闭的容器中于 15 ℃ 下保存 1 年半以上仍能保持较高萌发率^[34]。无忧树 (*Saraca asoca*) 种子在 15 ℃ 条件下贮藏,种子的寿命可延长 4 年^[35]。以上研究表明,对于顽拗性种子的初期保存来说,可以考虑在 4 ℃ 条件下保存过渡,但若需要更长时期的保存,则要根据各种子特性进行更深入的研究。

虽然顽拗性种子的短期保存策略有所成功,但仍然遭遇发芽率过低甚至无法发芽的问题,最重要的还是要通过了解种子特性来提升种子的耐脱水性。如顽拗性印加甜豆种子在 -2.0 MPa 的聚乙二醇 (PEG) 溶液中进行培养可增加其对脱水的耐受性,从而有利于保存^[36]。而利用杀菌剂对印加甜豆种子进行处理,发现杀菌剂处理降低了最常见真菌病害的发生率,可将未干燥胚胎的寿命从 90 d 延长到 120 d^[37]。Woodenberg 等通过观察苏铁种子胚和胚乳的组织结构来研究种子保存策略,认为其种胚可用于低温保存^[38]。Oliet 等通过研究顽拗性种子生长过程中的光温条件等,来探索其保存依据^[39]。Wesley - Smith 等观察顽拗性种子低温处理后其胚胎轴的细胞结构,发现低温所产生的冻结应力可使细胞自噬降解,最终可能引起细胞程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD) 信号从而影响保存^[40]。Walters 的研究表明,顽拗性种子在脱水情况下容易引起细胞液胞浆凝固,导致种子无法长期保存^[41]。而 Moothoo - Padayachie 等对比 *Trichilia dregeana*、海榄雌 (*Avicennia marina*) 2 种顽拗性种子的脱水和贮藏特性,表明其贮藏寿命主要受氧化还原代谢调节影响,但也有可能因物种而异^[42]。以上所有研究均表明,脱水和低温都会同时影响顽拗性种子的保存。实际上虽然同属顽拗性种子,但很多因物种而异,只能通过试验摸索才有可能总结出最适合某物种的超低温保存方法。因

此需要更多更深入的研究去阐明顽拗性种子不耐脱水、低温敏感的机制以及种子的抗旱和抗冻机制,才能为顽拗性种子的最佳保存方式提供基础。不管如何,顽拗性种子保存的总体方向都是在追求更好的超低温保存效果的同时,也能使材料得以恢复生长。

2 脱水及低温敏感性研究

2.1 脱水敏感性研究

2.1.1 顽拗性种子脱水过程中生理生化变化 种子顽拗性是在脱离母体后在种子发育过程中形成的,但直到发芽才表现出来,顽拗性种子最重要的功能特征就是不耐脱水且对低温敏感^[43]。前人研究已证实顽拗性种子的种子结构、糖含量、蛋白质含量、脱落酸含量、各种酶活性以及基因等与脱水敏感性密切相关。种子是否能有效保存是由种子成熟过程中脱水耐性的获得(即内因)和此过程中容易引起种子老化、劣变的外部因素(即外因)综合影响的结果。种子种胚在快速脱水时对呼吸能力、抗氧化活性、脂质过氧化、蛋白质合成率和胞内物质变化等生理生化都有影响,且呈正相关关系^[44],同时这些生理生化因子之间也会相互影响共同起到保护作用,但最终协同保护作用仍敌不过脱水所带来的伤害,这是种子最终失活的主要原因^[45],顽拗性种子脱水过程中一系列的生理生化活动与脱水耐性息息相关^[46]。

2.1.2 脱水敏感过程对可溶性糖、可溶性蛋白等的影响 越来越多的研究表明,顽拗性种子对脱水的敏感性与种子体内结构、糖含量、蛋白质含量等密切相关,大多数顽拗性种子对脱水敏感的原因是其种子组织中缺少棉籽糖、蔗糖及水苏糖等。顽拗性黄皮种子经历脱水后其可溶性蛋白含量明显增加,有可能是脱水导致内部原有的贮存蛋白转化为可溶性蛋白^[47]。有研究认为海榄雌种子缺乏足够的蔗糖来阻挡脱水伤害从而使种子在萌发过程中对脱水高度敏感,虽然海榄雌种子中也含有较高的水苏糖^[48],可见糖类对顽拗性种子脱水耐性的获得至关重要。但也有不一样的报道,在枳种子脱水过程中糖类内含物的积累是失水细胞降低水势、增强持水力的抗逆生理表现^[49]。另有研究报道,脱水过程中寡糖的增加可引起胞内玻璃化从而保护种子免受脱水伤害^[50]。因此,关于种子内含糖类对种子耐脱水性影响的作用还需要进一步研究,才能明确

其相关功能。

2.1.3 脱水过程对膜脂过氧化的影响 顽拗性种子遭受脱水伤害所引起的活力下降,与膜脂过氧化破坏膜结构和功能及因抗氧化保护系统活性降低、自由基积累而导致的细胞代谢紊乱密切相关^[44]。脂质过氧化一直被认为是加速种子衰老、劣变的主要原因之一,容易引起种子内部结构和功能的破坏,从而导致种子电解质大量外渗和膜脂过氧化产物的过度积累。蒲葵种子经历脱水伤害后,其抗氧化酶活性明显降低,同时产生脂质过氧化,严重影响种子活力甚至导致种子活力丧失^[51]。遭遇脱水的情况下,*Madhuca latifolia* 顽拗性种子脱水诱导的活力降低与活性氧(ROS, reactive oxygen species)的积累有关,ROS 的积累促进了膜脂过氧化相关膜的完整性丧失^[52]。顽拗性三七种子的脱水试验表明,脱水过程中抗氧化活性降低及膜脂过氧化作用是导致三七种子脱水敏感的主要原因^[53]。但也有相反的报道,宗梅等通过对不同发育阶段的板栗种子进行自然脱水,研究其脱水过程的动态变化,发现脱水敏感性与膜完整性并不完全相关^[54]。

针对膜脂过氧化带来的不利影响,部分种子也利用一些措施以缓解不利影响。Pukacka 等报道,在顽拗性种子萌发过程中,硒对增强细胞活力和抗氧化保护细胞免受活性氧毒害方面有积极作用^[55]。Sershen 等利用聚乙烯袋密封储存冬青栎种子,通过限制袋子内的气体交换来维持 H_2O_2 水平,更有利于种子储存^[43]。茶树顽拗性种子脱水过程中的氧化还原反应表明,降低活性氧有利于减缓脱水伤害,从而提高种子萌发率^[56]。木乃果种子随着脱水程度的加剧,其相对电解质渗透速率和膜质过氧化产物(TBARs)都呈升高趋势,但慢速脱水和快速脱水的升高幅度差异明显,前者更慢,更有利于种子萌发^[57]。勐海大叶茶种子也通过慢速脱水在一定程度上减少了种子的脱水伤害^[58]。因此,通过调节顽拗性种子的脱水速率来减缓膜脂过氧化程度是可行的。

2.1.4 脱水敏感过程对酶的影响 正常性种子通常通过完整的抗氧化系统来阻止因脱水而带来的伤害,而顽拗性种子同样具有完整的抗氧化系统。但由于顽拗性种子脱落后的高含水量及持续的代谢活动导致过氧化作用的加强及系统活性的下降,从而引起种子丧失活力。顽拗性三七种子脱水敏感的重要原因之一,就是抗氧化系统酶活性降低从

而无法消除氧化伤害甚至加剧了氧化伤害^[53,59]。同样的结论在板栗种子^[60]、枳种子^[49]、勐海大叶茶种子^[58]、黄皮种子^[47,61]、三七种子^[62]等种子上也得到了证实。自然脱水过程中,种子细胞膜系统受到损伤,而在异常的代谢活动中,ROS 特别是 H_2O_2 的积累导致顽拗性种子的细胞内结构有损伤,是顽拗性种子对脱水敏感的主要原因之一,但可通过调节抗氧化酶活性,将 ROS 降低到适当浓度来增强顽拗性种子的脱水耐受性^[56,63]。影响顽拗性种子脱水敏感性的因素很多,包括种子本身的物质基础,还有种子在生长过程中所经历的外部环境变化等^[64]。此外,种子水分分布模式、细胞壁的厚度及硬度与脱水敏感性也密切相关^[1]。如 *Podocarpus henkelii*、镰叶罗汉松(*Podocarpus falcatus*)等种子的脱水敏感性可能是由于脱水后期胚浆膜不能在复水后恢复其原始构象而造成的^[65]。因此,研究顽拗性种子可以参考正常性种子脱水和萌发过程中的脱水、修复及自我保护机制,来研究种子顽拗性的机制。

2.2 低温敏感性研究

对于顽拗性种子来说,种子脱水及低温敏感性都是其重要的功能特征。脱水敏感的种子同时往往对低温也敏感,与脱水敏感相比,低温敏感主要发生在保存过程中,因此往往是伴随超低温保存而进行的相关研究。颠茄顽拗性种子合子胚经低温保存后其亚细胞结构出现畸形,种子活力也明显衰退^[43]。Wesley-Smith 等观察了顽拗性银白槭(*Acer saccharinum*)种子低温保存后胚和胚乳的组织结构,发现细胞内结冰严重影响了种子的活力^[23]。能实现超低温保存的羯布罗香种子在超低温冷冻后其过氧化物酶、过氧化氢酶活性都明显降低,但 α -淀粉酶活性提高,丙二醛含量则无显著变化^[21]。低温往往容易使顽拗性种子活力丧失,因此如何提高顽拗性种子的低温耐受性成了新的研究重点。Bai 等对木乃果(*Baccaurea ramiflora*)进行一氧化碳(carbon monoxide, CO)处理,认为 CO 可作为外源调节因子,通过其介导的谷胱甘肽体内稳态来提高种子对低温的耐受性^[66]。温度和水分是种子保存过程中最关键的因子,在不影响种子活力的前提下尽量降低种子的贮藏温度及含水量,从而降低保存过程中的各项代谢活动,同时考虑通过外源因子处理进一步提高种子的脱水及低温耐受性,才能实现种子长期保存的目的。

2.3 分子机制研究

顽拗性种子对脱水及低温敏感,生理生化研究

涉及较多,但在分子机制方面,过去研究少有提及。随着近些年生物技术的迅猛发展,越来越多的生物技术手段被用于顽拗性种子的脱水及低温敏感性研究,但更多开展于脱水敏感性研究。Julien 等对比了正常的蒺藜苜蓿、栗豆树顽拗性种子在脱水过程中 LEA 多肽的测定情况,正常性种子检测到了 17 种 LEA 基因中的 16 种,而顽拗性种子中至少有 12 种是缺少或者急剧减少的,但其非种子特异性脱水蛋白却积累到较高水平^[67]。Wei 等通过转录组测序技术分析了桑寄生顽拗性种子脱水敏感过程中的基因表达变化,挖掘到了转录因子等一系列影响桑寄生顽拗性种子脱水敏感的重要基因^[68]。Jin 等使用 RNA-Seq 和数字基因表达(DGE)技术分析了茶树顽拗性种子 3 个脱水阶段的全基因组表达谱,最终确定了与茶叶种子脱水处理相关的 12 个基因的表达谱^[69]。这些研究手段都为顽拗性种子的脱水及低温敏感性机制的挖掘及顽拗性遗传资源的保存提供了基础。

除了转录组学研究外,蛋白质组学、代谢组学等技术手段也被用于其中,利用蛋白质组学技术研究脱水敏感机制的有 *Trichilia dregeana* 种子^[42]、南洋杉沙枣种子^[70]、梧桐种子^[71]等,这些研究都挖掘到了与脱水敏感密切相关的关键蛋白和关键代谢通路,如热休克蛋白等。Radwan 等同时研究了顽拗性种子、正常性种子及中间性种子脱水过程中脱水蛋白(Dehydrins)的表达情况,发现该蛋白在 3 类种子脱水过程中均有表达,但表达量有明显差异,与种子的成熟度以及脱水情况密切相关^[72]。此外,Plitta-Michalak 等通过比较正常性种子和顽拗性种子在脱水过程中的甲基化水平变化,表明 2 种种子的胚轴、子叶在 DNA 甲基化水平下对脱水的反应存在明显差异^[73]。Calvi 等研究了大果番樱桃(*Eugenia stipitata*)顽拗性种子脱水过程中的活力变化情况,发现脱水过程会导致谷胱甘肽(EGSSG/2)降低,从而影响种子的死亡^[74]。Azarkovich 等对七叶树顽拗性种子脱水过程的水溶性蛋白及结构进行了研究,和正常性种子相比,干燥过程中顽拗性种子可能缺失由基因决定的典型的存储蛋白^[75]。而对于如何从分子角度降低脱水伤害也有部分研究。Mazlan 等用代谢组学手段分析了山竹子(*Garcinia mangostana*)顽拗性种子的发育过程,表明甘草酸 A1、芸香苷、绿原酸等水平的升高可能会增强种子的自我保护和防御^[76]。而通过对比正常

性种子和顽拗性种子的发育情况,发现种子后期通过合成 LEA 蛋白、热休克蛋白和糖类等物质可获得耐脱水能力^[77-78]。总的来说,对于脱水敏感性的研究明显多于对低温敏感机制的研究,可能是低温下种子更容易丧失活力从而影响了更多的后续研究。相信随着分子生物学技术的发展,从分子水平探讨顽拗性种子的脱水及低温敏感机制、原因及其脱水修复机制将成为可能。

3 展望

种子保存是最直接、最高效且经济的种质资源保护方式。在自然界中,大部分植物的种子属于正常性种子,都能实现有效的长期保存。而顽拗性种子对脱水和低温都非常敏感,常规的低温种子库不仅不能有效保存顽拗性种子,相反还会导致种子活力丧失从而加速死亡。顽拗性种子和正常性种子以及中间性种子都是在长期的自然环境中进化形成的种子特性。顽拗性种子植物多产于热带、亚热带中高温而又湿润的地区,且多为大型种子或大粒种子,已逐渐进化出一套与其栖息地相适应的生存机制,同时也是一种进化选择优势。而如何保存这些生产顽拗性种子的植物一直是植物种质资源保护工作的重点和难点,本文认为可从以下 3 个方面考虑:

(1)开展顽拗性种子生态适应机制研究。顽拗性种子的生态适应性一直是种子科学研究领域的热点和难点。这些“特殊”的种群往往是整个植物生态系统里的重要组成部分,因此这些种群的延续和发展在一定程度上往往可以影响整个植物的生态环境。然而相关的研究多数仅涉及种子本身的发育及顽拗性的初步认识,缺少对其生态适应机制的探讨。因此了解顽拗性种子的生态适应机制,特别是对干旱和低温环境的生理生态适应机制,将为种子保存和利用提供新的视角。

(2)继续深入开展超低温保存研究。现阶段来说,超低温保存仍被认为是长期保存顽拗性种子的最佳方式。然而,在过去的研究中,不少顽拗性种子的超低温保存试验都未获得成功,迄今为止仅有少数顽拗性种子能通过超低温技术实现长期保存。其主要原因是,从超低温环境中取出种子后会造成顽拗性种子活力丧失,造成超低温伤害。尽管在超低温保存过程中超低温伤害是普遍现象,但顽拗性种子超低温储存及其低温生理机制尚待探究,其背

后的相关机制亟须更深入的研究。

(3)深入挖掘控制顽拗性种子具顽拗性的重要功能基因,利用分子手段揭示种子顽拗性形成的真正内在原因。因此,应进一步系统性地研究顽拗性种子的内部结构、生理生化特质、进化机制等,并通过最新的组学(基因组学、转录组学、蛋白质组学等)整合手段,同时加强施加外源影响因子的研究,这些对顽拗性种子的本质认识以及更好地解决顽拗性种子的贮藏具有重要意义。

参考文献:

- [1] Ashley S, Syd R, Norman P, et al. Towards understanding the incidence and evolutionary history of seed recalcitrance: an analytical review [J]. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 2019, 37: 11 - 19.
- [2] Linington S H, Pritchard H W. Gene banks. In: Levin SA Encyclopedia of biodiversity [M]. vol 3. New York: Academic Press, 2001: 165 - 181.
- [3] Roberts E H. Predicting the storage life of seeds [J]. Seed Science and Technology, 1973, 1: 499 - 514.
- [4] Ntuli T M, Berjak P, Pammenter N. Different assessments of the effect of drying rates on recalcitrant seed material [J]. American Journal Biology and Life Sciences, 2015, 3(3): 75 - 79.
- [5] Pammenter N W, Berjak P. Physiology of desiccation - sensitive (recalcitrant) seeds and implications for cryopreservation [J]. International Journal of Plant Sciences, 2014, 175(1): 21 - 28.
- [6] Berjak P, Pammenter N W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds [J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4(2): 478.
- [7] Goh H H, Abu Bakar S, Kamal Azlan N D, et al. Transcriptional reprogramming during Garcinia - type recalcitrant seed germination of *Garcinia mangostana* [J]. Scientia Horticulturae, 2019, 257: 108727.
- [8] Chmielarz P, Michalak M, Pałucka M, et al. Successful cryopreservation of *Quercus robur* plumules [J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(8): 1405 - 1414.
- [9] Al Z O, Normah M N. Desiccation sensitivity and cryopreservation of excised embryonic axes of *Citrus suhuiensis* cv. limau madu, Citrumelo [*Citrus paradisi* Macf. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] and *Fortunella polyandra* [J]. Cryo Letters, 2012, 33(3): 241 - 251.
- [10] Al Z M, Normah M N. cryopreservation of malayan kumquat (*Fortunella polyandra*) embryonic axes by vitrification [J]. Australian Journal of Crop Science, 2013, 7(6): 758 - 762.
- [11] 文 彬. 植物种质资源超低温保存概述 [J]. 植物分类与资源学报, 2011, 33(3): 311 - 329.
- [12] Pammenter N W, Berjak P. Physiology of desiccation sensitive (recalcitrant) seeds and the implications for cryopreservation [J]. International Journal of Plant Sciences, 2014, 175(1): 21 - 28.
- [13] Ibrahim S, Normah M N. The survival of *in vitro* shoot tips of

- Garcinia mangostana* L. after cryopreservation by vitrification[J]. Plant Growth Regulation, 2013, 70(3): 237–246.
- [14] Norafarain S, Nurul F S, Normah M N. Critical vitrification steps towards survival of *Garcinia hombroniana* (Clusiaceae) shoot tips after cryopreservation[J]. Revista de Biologia Tropical, 2018, 66(3): 1314–1323.
- [15] Lan Q Y, Luo Y L, Qiu Y P, et al. Storage of recalcitrant seeds of *Antiaris toxicaria* (Moraceae) [J]. Seed Science and Technology, 2014, 42: 97–100.
- [16] Wen B, Wang R L. Pretreatment incubation for culture and cryopreservation of *Sabal embryos* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2010, 102(2): 237–243.
- [17] Wen B. Cytological and physiological changes related to cryotolerance in recalcitrant *Livistona chinensis* embryos during seed development[J]. Protoplasma, 2011, 248(3): 483–491.
- [18] Dias D S, Lopes P, Ribeiro L M, et al. Tolerance of desiccation and cryopreservation of *Butia capitata* palm seeds [J]. Seed Science Technology, 2015, 43(1): 90–100.
- [19] 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): 1727.
- [20] 曾琳, 顾雅坤, 吴怡, 等. 超低温对降香种子遗传变异和生理特性的影响[J]. 热带作物学报, 2018, 39(9): 1732–1738.
- [21] 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.
- [22] 曾琳, 顾雅坤, 吴怡, 等. 超低温冷冻对羯布罗香种子结构和生理生化特性的影响[J]. 热带亚热带植物学报, 2018, 26(3): 249–254.
- [23] Wesley-Smith J, Berjak P, Pammenter N W, et al. Intracellular ice and cell survival in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*: an ultrastructural study of factors affecting cell and ice structures [J]. Annals of Botany, 2014, 113(4): 695–709.
- [24] 韦树根. 桑寄生顽拗性种子生物学特性及脱水敏感性机理研究 [D]. 北京: 北京协和医学院 & 中国医学科学院, 2017.
- [25] 万凌云, 裴河欢, 付金娥, 等. 桑寄生种子的顽拗性生物学特征及保存技术研究[J]. 种子, 2019, 38(12): 48–53.
- [26] 杨书运. 茶树冻害防控方法的研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.
- [27] 肖春芬, 杨成叶, 苏艳萍. 治疗药物成瘾植物非洲马铃果种子萌发的初步研究[J]. 种子, 2013, 32(5): 100–105.
- [28] 计明月, 张楠, 闫启, 等. 顽拗性竹柏种子的贮藏特性[J]. 植物分类与资源学报, 2015, 37(1): 63–70.
- [29] 罗婷婷. 基于黄连种子后熟生理特性的种子保存技术的初步研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [30] 邢丽伟. 北细辛种子贮藏生理生化变化及其修复技术研究 [S]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [31] 张俊杰, 柴胜丰, 王满莲, 等. 珍稀濒危植物金丝李种子脱水耐性和贮藏特性[J]. 广西植物, 2019, 39(2): 199–208.
- [32] Hathurusingha S, Ashwath N. *Calophyllum inophyllum*: recalcitrant or intermediate seed? [J]. Journal of Forestry Research, 2012, 23(1): 103–107.
- [33] Lan Q Y, Luo Y L, Ma S M, et al. Development and storage of recalcitrant seeds of *Hopea hainanensis* [J]. Seed Science and Technology, 2012, 40(2): 200–208.
- [34] Joshi G, Phartyal S S, Arunkumar A N. Non-deep physiological dormancy, desiccation and low-temperature sensitivity in seeds of *Garcinia gummi-gutta* (Clusiaceae): a tropical evergreen recalcitrant species [J]. Tropical Ecology, 2017, 58(2): 241–250.
- [35] Kundu M, Tiwari S, Haldkar M. Collection, germination and storage of seeds of *Saraca asoca* (Roxb.) Willd [J]. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2020, 16: 100231.
- [36] Bonjovani M R, Claudio C J. Induction of tolerance to desiccation and to subzero temperatures in embryos of recalcitrant seeds of inga [J]. Journal of Seed Science, 2014, 36(4): 419–426.
- [37] Parisi J J, Biagi J D, Medina P F, et al. Fungicide and drying effects on the viability of recalcitrant seeds of *Inga vera* subsp. *affinis* [J]. Tropical Plant Pathology, 2016, 41(3): 177–182.
- [38] Woodenberg W R, Berjak P, Pammenter N. Development of cycad ovules and seeds. 2. Histological and ultrastructural aspects of ontogeny of the embryo in *Encephalartos natalensis* (Zamiaceae) [J]. Protoplasma, 2014, 251(4): 797–816.
- [39] Oliet J A, Vázquez De Castro A, Puértolas J. Establishing *Quercus ilex* under Mediterranean dry conditions: sowing recalcitrant acorns versus planting seedlings at different depths and tube Shelter light transmissions [J]. New Forests, 2015, 46(5/6): 869–883.
- [40] Wesley-Smith J, Walters C, Pammenter N W, et al. Why is intracellular ice lethal? A microscopical study showing evidence of programmed cell death in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum* [J]. Annals of Botany, 2015, 115(6): 991–1000.
- [41] Walters C. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss [J]. Planta, 2015, 242(2): 397–406.
- [42] Moothoo-Padayachie A, MacDonald A, Varghese B, et al. Uncovering the basis of viability loss in desiccation sensitive *Trichilia dregeana* seeds using differential quantitative protein expression profiling by iTRAQ [J]. Journal of Plant Physiology, 2018, 221(2): 119–131.
- [43] Seršen, Berjak P, Pammenter N W, et al. The effects of various parameters during processing for cryopreservation on the ultrastructure and viability of recalcitrant zygotic embryos of *Amaryllis belladonna* [J]. Protoplasma, 2012, 249(1): 155–169.
- [44] Seršen, Varghese B, Naidoo C, et al. The use of plant stress biomarkers in assessing the effects of desiccation in zygotic embryos from recalcitrant seeds: challenges and considerations [J]. Plant Biology, 2016, 18(3): 433–444.
- [45] 申婵, 钟芙蓉, 黄玲, 等. 快速脱水对后熟黄连种子萌发及生理化生的影响[J]. 中药材, 2019, 42(4): 720–724.
- [46] 宗梅, 蔡永萍, 范志强. 板栗种子发育期间 ABA 等生理指标与脱水耐性的相关性研究 [J]. 广西植物, 2011, 31(6): 818–

- 822.
- [47] 曾桃, 蔡翼, 莫少琼, 等. 脱水处理对黄皮种子生理生化的影响[J]. 广东农业科学, 2013, 40(6): 35–38.
- [48] Yang H L, Liu J, Huang S M, et al. Selection and evaluation of novel reference genes for quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) based on genome and transcriptome data in *Brassica napus* L. [J]. Gene, 2014, 538(1): 113–122.
- [49] 马文涛, 樊卫国, 裴芸. 枳种子对脱水的敏感性及其在脱水过程中的生理响应[J]. 西南农业学报, 2011, 24(3): 928–931.
- [50] 朱丽伟, 曹栋栋, 付玉营, 等. 可溶性寡糖和小分子的热激蛋白与杂交水稻种子成熟过程中发芽能力及种子活力相关[J]. 作物学报, 2016, 42(5): 714–724.
- [51] 李朋, 唐安军, 柳建平, 等. 蒲葵种子脱水耐性及脱水对其膜脂过氧化的影响[J]. 园艺学报, 2011, 38(8): 1572–1578.
- [52] Chandra J, Keshavkant S. Desiccation-induced ROS accumulation and lipid catabolism in recalcitrant *Madhuca latifolia* seeds[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2018, 24(1): 75–87.
- [53] 段银妹, 杨莉, 段承俐. 三七种子的脱水敏感性与膜质过氧化作用[J]. 种子, 2014, 33(4): 6–9.
- [54] 宗梅, 蔡永萍. 不同发育阶段板栗种子的脱水敏感性[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(8): 21–23.
- [55] Pukacka S, Ratajczak E, Kalembe E. The protective role of selenium in recalcitrant *Acer saccharum* L. seeds subjected to desiccation[J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(3): 220–225.
- [56] Chen Q, Yang L, Ahmad P, et al. Proteomic profiling and redox status alteration of recalcitrant tea (*Camellia sinensis*) seed in response to desiccation[J]. Planta, 2011, 233(3): 583–592.
- [57] 路信, 罗银玲, 王一帆, 等. 不同脱水速率对木奶果种子脱水敏感性及其抗氧化酶活性的影响[J]. 云南植物研究, 2010, 32(4): 361–366.
- [58] 陈志欣, 包云秀, 郑丽, 等. 不同脱水速率对勐海大叶茶种子脱水敏感性与抗氧化酶活性的影响[J]. 云南农业大学学报, 2012, 27(2): 241–247.
- [59] 杨凯, 李磊, 龙光, 等. 顽拗性三七种子后熟过程超微结构和抗氧化酶变化[J]. 广西植物, 2016, 36(12): 1519–1525.
- [60] 武森. NADPH 氧化酶在不同脱水敏感性种子板栗和玉米萌发时作用机理的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2011.
- [61] 王伟青, 程红焱, 刘树君, 等. 黄皮种子线粒体呼吸速率和活性氧清除酶活性对脱水的响应及其生态学意义[J]. 植物生态学报, 2012, 36(8): 870–879.
- [62] 李磊, 孙雪婷, 张广辉, 等. 脱水速率对顽拗性三七种子脱水敏感性和抗氧化酶活性的影响[J]. 种子, 2014, 33(12): 1–5.
- [63] Bai X G, Yang L M, Tian M H, et al. Nitric oxide enhances desiccation tolerance of recalcitrant *Antiaris toxicaria* seeds via protein S-nitrosylation and carbonylation[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e20714.
- [64] 路信, 兰芹英, 杨明攀. 龙脑香科植物种子特性的研究进展[J]. 种子, 2010, 29(5): 46–55.
- [65] Woodenberg W R, Serphen, Varghese B, et al. Zygotic embryo cell wall responses to drying in three gymnosperm species differing in seed desiccation sensitivity[J]. Protoplasma, 2018, 255(5): 1461–1475.
- [66] Bai X G, Chen J H, Kong X X, et al. Carbon monoxide enhances the chilling tolerance of recalcitrant *Baccaurea ramiflora* seeds via nitric oxide-mediated glutathione homeostasis[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2012, 53(4): 710–720.
- [67] Delahaie J, Hundertmark M, Bove J, et al. LEA polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals ABI3-regulated LEA protein abundance linked to desiccation tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(14): 4559–4573.
- [68] Wei S, Ma X, Pan L, et al. Transcriptome analysis of *Taxillus chinensis* (DC.) danser seeds in response to water loss[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0169177.
- [69] Jin X F, Liu D D, Ma L L, et al. Transcriptome and expression profiling analysis of recalcitrant tea (*Camellia sinensis* L.) seeds sensitive to dehydration[J]. International Journal of Genomics, 2018: 5963797.
- [70] Balbuena T S, Jo L, Pieruzzi F P, et al. Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia* [J]. Phytochemistry, 2011, 72(4/5): 302–311.
- [71] Kalembe E M, Pukacka S. Association of protective proteins with dehydration and desiccation of *Orthodox* and *Recalcitrant* category seeds of three *Acer* genus species[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2012, 31(3): 351–362.
- [72] Radwan A, Hara M, Kleinwächter M, et al. Dehydrin expression in seeds and maturation drying: a paradigm change[J]. Plant Biology (Stuttgart, Germany), 2014, 16(5): 853–855.
- [73] Plitta-Michalak B P, Naskret-Barciszewska M Z, Kotlarski S, et al. Changes in genomic 5-methylcytosine level Mirror the response of orthodox (*Acer platanoides* L.) and recalcitrant (*Acer pseudoplatanus* L.) seeds to severe desiccation[J]. Tree Physiology, 2018, 38(4): 617–629.
- [74] Calvi G P, Aud F F, Ferraz I D, et al. Analyses of several seed viability markers in individual recalcitrant seeds of *Eugenia stipitata* McVaugh with totipotent germination[J]. Plant Biology (Stuttgart, Germany), 2017, 19(1): 6–13.
- [75] Azarkovich M I, Bolyakina Y P. Recalcitrant seeds of horse chestnut lack protein bodies[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2016, 63(4): 499–504.
- [76] 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.
- [77] Wm W, Bray C M, West C E. The importance of safeguarding genome integrity in germination and seed longevity[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(12): 3549–3558.
- [78] Ebone L A, Caverzan A, Chavarria G. Physiologic alterations in orthodox seeds due to deterioration processes[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 145: 34–42.