

Preliminary Study on Cryopreservation of *Artemisia annua* L. Seeds

Cui Li, Ming Lei, Dongliang Chen, Xiaoyun Guo, Zhanjiang Zhang, Xiaoying Chen*

Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants/Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Conservation and Genetic Improvement, Nanning Guangxi
Email: licuicui941@aliyun.com, *chxying2016@sina.com

Received: Jul. 1st, 2020; accepted: Jul. 17th, 2020; published: Jul. 24th, 2020

Abstract

To study the cryopreservation method of *Artemisia annua* L. seeds. Direct freezing, slow freezing and vitrification methods were used to cryopreserve the seeds of *A. annua*. The germination rates at 15°C, 20°C and 25°C before and after cryopreservation were used to evaluate the cryopreserved efficiency. After cryopreservation, slow freezing method had higher germination rates than direct freezing method and vitrification method. And before and after cryopreservation, the seed germination rates reached 94% and 91.5% respectively at 20°C. The optimum cryopreservation method for seeds of *A. annua* was slow freezing, and the optimum germination temperature was 20°C when cultivated after cryopreservation.

Keywords

Artemisia annua L., Seeds, Cryopreservation, Germination Rate

黄花蒿种子超低温保存方法初探

李 翠, 雷 明, 陈东亮, 郭晓云, 张占江, 陈晓英*

广西壮族自治区药用植物园/广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西 南宁
Email: licuicui941@aliyun.com, *chxying2016@sina.com

收稿日期: 2020年7月1日; 录用日期: 2020年7月17日; 发布日期: 2020年7月24日

摘 要

试验采用直接冷冻法、缓慢冷冻法、玻璃化法对黄花蒿种子进行超低温保存初步研究, 以保存前后种子

*通讯作者。

在15℃、20℃、25℃时的发芽率来检测超低温保存效果。结果表明经过液氮冻存72 h后,采用缓慢冷冻法保存后的种子发芽率高,平均在84%以上,且超低温保存前后黄花蒿种子都在20℃时发芽率最高,分别达到94%和91.5%。研究表明黄花蒿种子超低温保存宜采用缓慢冷冻法,保存后恢复培养时的适宜发芽温度为20℃。

关键词

黄花蒿, 种子, 超低温保存, 发芽率

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

黄花蒿 *Artemisia annua* L.是菊科蒿属一年生草本植物,以干燥地上部分(叶片、嫩枝、花蕾)入药[1],是抗疟有效药物青蒿素的唯一天然基源植物[2]。黄花蒿主要依靠种子繁殖,种子贮藏时间的长短、种子发芽时的温度、种子发芽时的光照条件等因素都会影响种子的发芽率从而最终影响到药材产量[3],因此,如何能够有效保存黄花蒿的种质资源是一个研究重点。

超低温保存被认为是目前最有效的植物种质资源保存方法,是通过将植物的种子、花粉、茎尖、愈伤组织等植物材料投放至-196℃的液氮中进行超低温冻存的方式来保存种质资源,在此温度下,植物细胞内的新陈代谢和生理活动几乎处于生长停顿状态,能最大限度的减少外界环境对种质资源及基因的影响,使种质资源得以长期保存[3][4]。超低温保存的冷冻处理方法有多种,常用的方法包括直接冷冻法[5]、缓慢冷冻法[6]、玻璃化法[7][8]。由于超低温保存方法具有种质特异性,不同植物材料的保存方法各异。本研究采用直接冷冻法、缓慢冷冻法、玻璃化法这三种超低温保存的方法,通过比较黄花蒿种子的发芽情况来评价三种超低温保存方法的效果,以期提供合适的黄花蒿种子超低温保存的方法,为黄花蒿种质资源的长期保存提供理论依据。

2. 材料与方法

2.1. 材料

黄花蒿种子 2018 年 11 月由广西壮族自治区药用植物园种子库提供,种子萌发试验等相关实验在广西壮族自治区药用植物园广西药用资源保护与遗传改良重点实验室进行。

2.2. 方法

2.2.1. 直接冷冻法

将黄花蒿种子放入 2 ml 冻存管中,直接投入液氮罐中保存 72 h;恢复培养时取出保存的黄花蒿种子,转至铺有双层滤纸的培养皿中,保持滤纸发芽床湿润,每天记录种子发芽数量。

2.2.2. 缓慢冷冻法

将黄花蒿种子放入含有冷冻保护液 PVS2 (MS + 30%甘油 + 15%二甲基亚砷 + 15%乙二醇 + 40% 0.4 mol/L 蔗糖)的冷冻管中,先放到 4℃冰箱中 0.5 h,取出立即放入-20℃的冰箱中 1 h,再立即取出放入-80℃的超低温冰箱中 1 h,最后放入-196℃的液氮罐中保存 72 h;解冻时取出在液氮中保存 72 h 的黄花

蒿种子, 放入 40℃ 水浴锅化冻 2 min; 然后进行卸载, 即将解冻的黄花蒿种子放入卸载液(MS + 1.2 mol/L 蔗糖)中洗涤两次, 每次 10 min; 再放入无菌水中洗涤 2 次, 每次 5 min; 最后进行恢复培养, 即将洗涤好的种子转至培养皿中, 保持滤纸发芽床湿润, 每天记录种子发芽数量。

2.2.3. 玻璃化冷冻法

室温下将黄花蒿种子放入装载液(MS + 2 mol/L 甘油 + 0.4 mol/L 蔗糖)中 20 min, 再转入 PVS2 中冰水浴 30 min, 冰水浴后将黄花蒿种子转入含有新鲜预冷的 PVS2 冻存管中, 迅速放入液氮罐中保存 72 h; 然后同缓慢冷冻法一样, 逐步进行解冻、卸载、恢复培养。

2.3. 黄花蒿种子的发芽方法

用 BIC-400 人工气候箱(上海博证实业有限公司医疗设备厂)进行黄花蒿种子发芽实验, 人工气候箱的光强设置为 800 lux, 光照周期为 12 h:12 h, 相对湿度设置为 60%。发芽实验方法参考曲艳等[9], 以不经冷冻处理的黄花蒿种子为对照, 对照和 3 种方法保存的种子发芽温度均设置为 15℃、20℃、25℃, 各 4 次重复, 每重复 50 粒种子, 超低温保存时间均为 72 h。种子发芽标准是将两片子叶正常展开视为种子发芽, 3 天内无新种子发芽视为种子发芽过程结束。种子发芽率 = 种子发芽数/实验种子数 × 100%。

2.4. 数据处理

数据分析用 IBM SPSS Statistics 24.0 统计软件, 多重比较采用 Duncan 法($P < 0.05$)。

3. 结果与分析

3.1. 超低温保存方法对黄花蒿种子发芽的影响

超低温保存的效果可用黄花蒿种子的发芽情况来判定。由表 1 可看出, 缓慢冷冻法的发芽率和发芽持续时间均与对照无显著差异; 其次是玻璃化法, 其发芽率显著低于对照, 但发芽持续时间与对照无明显差异; 而直接冷冻法不仅其发芽率显著低于其他方法, 且发芽持续时间也显著高于其他方法。这些结果说明黄花蒿种子超低温保存时宜采用缓慢冷冻法。

Table 1. Effect of cryopreservation on seed germination of *Artemisia annua* L.

表 1. 超低温保存方法对黄花蒿种子发芽的影响

保存方法	发芽率(%)	发芽持续时间(d)
对照	88.33 ± 1.65 a	12.08 ± 1.02 b
直接冷冻法	75.33 ± 1.81 c	13.33 ± 1.14 a
缓慢冷冻法	84.50 ± 2.19 a	12.50 ± 1.16 b
玻璃化法	79.83 ± 1.90 b	12.67 ± 1.16 ab

注: 同列不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$)。

3.2. 超低温保存前后发芽温度对黄花蒿种子发芽的影响

种子发芽时的温度直接影响种子的发芽率。由表 2 可看出, 在超低温保存前, 对照的黄花蒿种子发芽率在 20℃ 时大约为 94%, 显著高于 15℃ 和 25℃ ($p < 0.05$)。在用直接冷冻法、缓慢冷冻法、玻璃化法进行超低温保存后, 20℃ 时黄花蒿种子的发芽率也均显著高于 15℃ 和 25℃; 从发芽持续时间看, 这三种超低温保存方法与对照一样, 均是在 15℃ 时发芽持续时间最长而在 20℃、25℃ 时无显著差异。这些结果说明超低温保存后黄花蒿种子最适宜的发芽温度同对照一样, 都是 20℃。

Table 2. Effect of temperature on germination rate of cryopreservation of *Artemisia annua* L. seeds
表 2. 温度对黄花蒿种子超低温保存发芽率的影响

(冷冻)处理方式	发芽温度(°C)	开始发芽时间/d	达到发芽高峰时间/d	发芽率(%)	发芽持续时间(d)
对照	15	4	6	83.50 ± 1.26 b	16.75 ± 0.48 a
	20	2	4	94.00 ± 2.94 a	10.25 ± 0.25 b
	25	2	3	87.50 ± 0.96 b	9.25 ± 0.25 b
直接冷冻法	15	4	6	71.50 ± 2.22 b	18.50 ± 0.65 a
	20	2	4	82.00 ± 1.41 a	11.50 ± 0.29 b
	25	2	3	72.50 ± 2.63 b	10.00 ± 0.41 b
缓慢冷冻法	15	4	6	82.00 ± 2.16 b	17.75 ± 0.75 a
	20	2	4	91.50 ± 3.20 a	10.50 ± 0.29 b
	25	2	3	80.00 ± 3.56 b	9.25 ± 0.48 b
玻璃化法	15	4	6	76.00 ± 1.15 b	18.00 ± 0.41 a
	20	2	4	87.00 ± 1.73 a	10.50 ± 0.50 b
	25	2	3	76.50 ± 3.10 b	9.50 ± 0.29 b

注：同列不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$)。

4. 讨论

4.1. 黄花蒿种子适宜的超低温保存方法是缓慢冷冻法

超低温保存是否成功可用从种子开始放入液氮内到取出后是否有一定的发芽率来判断[10]。本研究采用直接冷冻法、缓慢冷冻法、玻璃化法对黄花蒿种子进行超低温保存，结果显示这三种超低温保存方法的黄花蒿种子发芽率都在 75%以上，表明用超低温保存的方法来保存黄花蒿种质资源是可行的。

本研究的结果进一步显示缓慢冷冻法比玻璃化法和直接冷冻法更适宜的黄花蒿种子超低温保存方法。直接冷冻法的种子可不受化学试剂的伤害，又能缩短实验时间，节约实验成本，但不是所有种质都适用[11]。而缓慢冷冻法和玻璃化法都使用 PVS2 作为冷冻保护剂，PVS2 能使植物材料在液氮中快速降温至固化到玻璃态，使细胞进一步脱水，减轻伤害，提高存活率[7]。本研究结果一方面说明了黄花蒿种子在超低温保存时需要使用 PVS2 对种子进行冷冻保护，另一方面，缓慢冷冻法的发芽率显著高于玻璃化法说明了黄花蒿种子在超低温保存时可以不使用装载液。总起来说，我们的研究证实了缓慢冷冻法是一种安全、有效的保存黄花蒿种子的超低温保存方法。

4.2. 超低温保存保持了黄花蒿种子的生理特性

从超低温保存前后黄花蒿种子在 15°C、20°C、25°C 的发芽率和发芽持续时间的结果可以看出，20°C 光照培养下，黄花蒿种子发芽速度快，第 4 天可达到发芽高峰期，发芽持续过程短，第 11 天发芽结束，种子发芽率高，这表明超低温保存后的黄花蒿种子保持了与超低温保存前相同的生理特性。最终实验表明黄花蒿种子在 20°C 时发芽率最高。

实际上，鉴于理论上超低温保存的植物材料不会发生遗传变异，目前的超低温保存研究大多还是以短期保存为主，与我们的结果类似，尹明华和洪森荣等[8]探讨了预培养时间和预培养液蔗糖浓度、装载时间、脱水时间、化冻温度、洗涤液中蔗糖浓度、冻后培养条件对黄独 *Dioscorea bulbifera* L. 微型块茎胚性愈伤组织超低温保存的影响。胡继文等[12]探讨了基因型、细胞年龄及生长状态、冷冻保护剂和各种预

处理方法、不同超低温冷冻方法及降温速率等对云杉属 *Picea* spp. 胚性组织培养物超低温保存的影响, 得出了最佳的超低温保存方式。不仅如此, 也有研究证实了超低温保存在保持种质资源的稳定性和生理生化特性方面的效果, 如石思信等[13]的研究发现, 含水量在 5.8%~16.0%的春小麦品种他诺瑞的种子在超低温条件下保存 11 年(1980~1992 年)后, 种子的萌发能力、田间主要农艺性状、根尖细胞染色体异常频率、过氧化物同工酶谱、醇溶蛋白电泳图谱均与对照相比无明显差异, 表明长期超低温保存的小麦种子保持了很好的遗传稳定性。本研究指出了黄花蒿种子短期超低温保存的最佳方式, 当然如果开展种质资源的长期保存, 需要开展深入的形态、遗传稳定性等方面的考察。

基金项目

广西科技计划项目“药用资源保护与应用技术创新平台建设”(桂科 AD17292004); 中央引导地方科技发展专项“药用植物资源保存能力提升工程”(桂科 ZY1949023); 广西壮族自治区药用植物园创新团队项目“药用植物种质资源超低温保存技术研究”(桂药创 2019011)。

参考文献

- [1] 马小军, 韦树根, 冯世鑫, 等. 黄花蒿新品种“桂蒿 3 号”[J]. 园艺学报, 2010, 37(1): 169-170.
- [2] 马婷玉, 向丽, 张栋, 等. 青蒿(黄花蒿)分子育种现状及研究策略[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(15): 3041-3050.
- [3] 董青松, 马小军, 冯世鑫, 等. 黄花蒿种子发芽试验研究[J]. 中国种业, 2008(8): 47-48.
- [4] 王晗, 雷秀娟, 宋娟, 等. 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, 2015, 2(2): 70-73.
- [5] 曾琳, 何明军, 顾雅坤, 等. 五种豆科药用植物种子超低温保存技术研究[J]. 生物资源, 2017, 39(1): 42-47.
- [6] 曹柏. 超低温保存对玉蝉花种子生理特性影响及再生体系建立[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2016.
- [7] 石茹, 王芳, 王舰. 玻璃化法超低温保存技术及其研究进展[J]. 北方园艺, 2011(24): 231-235.
- [8] 尹明华, 洪森荣. 黄独微型块茎胚性愈伤组织超低温保存及遗传稳定性研究[J]. 中草药, 2015, 46(17): 2623-2631.
- [9] 曲艳, 李青丰, 贺一鸣, 等. 牛心朴子种子萌发特性及对干旱胁迫的响应[J]. 种子, 2019, 38(7): 37-41.
- [10] 王荷, 刘燕. 25 种野生花卉种子超低温保存研究[J]. 种子, 2011, 30(4): 80-82.
- [11] 曾琳, 何明军, 吴怡, 等. 6 种草本药用植物种子超低温保存技术研究[J]. 热带作物学报, 2017, 38(6): 1149-1154.
- [12] 胡继文, 凌娟娟, 朱天擎, 等. 云杉属胚性组织超低温保存技术研究进展[J]. 温带林业研究, 2019, 2(1): 7-12.
- [13] 石思信, 张志娥, 肖建平. 超低温(-196℃)保存 11 年后小麦种子的活力[J]. 中国农学通报, 1994, 10(5): 12-15.