

超低温冷冻对龙眼种子生理生化特性的影响

李珊珊, 孙 政*, 曾 琳**

中国医学科学院/北京协和医院/药用植物研究所海南分所/海南省南药资源保护与开发重点实验室, 海南海口 570311

摘 要: 龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 原产于我国南方, 在南部和东南部地区广泛栽培, 是经济价值较高的果树。龙眼种子作为典型的顽拗性种子, 对低温和干燥具有高度敏感性, 因此在传统的低温种子库中难以保存。本研究在排除冰晶对种子影响后, 对新鲜和干燥种子进行玻璃化冷冻和直接冷冻超低温保存, 并比较生理生化指标、内含物和淀粉的变化。结果表明: 在经过脱水和超低温保存后, 龙眼种子活力急剧下降; 与新鲜种子相比, 脱水导致丙二醛含量大幅度增加, 细胞膜受损严重; 过氧化氢含量呈下降趋势; 抗氧化酶系统表达增加, 含水量 16% 的龙眼种子玻璃化冷冻处理后 SOD 活性最高, 且玻璃化冷冻处理降低了 POD 和 CAT 活性。低温和脱水导致种子内可溶性糖和可溶性蛋白质含量增加, 脱水导致蛋白质变性, 含量降低。观察龙眼种子淀粉发现, 经过玻璃化冷冻处理后淀粉颗粒表面有空洞和凹陷生成, 直接冷冻处理造成淀粉颗粒破裂。脱水和低温对淀粉分子结构未造成影响, 但对内部有序结构造成了一定程度的破坏。

关键词: 超低温冷冻; 生理生化特性; 顽拗性种子; 龙眼

中图分类号: S667.2

文献标志码: A

Effect of Cryopreservation on the Physiological and Biochemical Characteristics of Longan Seeds

LI Shanshan, SUN Zheng*, ZENG Lin**

Chinese Academy of Medical Sciences / Peking Union Medical College / Hainan Branch, Institute of Medicinal Plant Development / Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine, Haikou, Hainan 570311, China

Abstract: Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) is native to southern China and widely cultivated in the southern and southeastern regions. It is a fruit tree with high economic value. Longan seeds, as a typical recalcitrant seed, are highly sensitive to low temperature and drying, making them difficult to preserve in traditional low-temperature seed banks. After excluding the influence of ice crystals on seeds, this study conducted vitrification freezing and direct freezing ultra-low temperature storage on fresh and dry seeds, and compared the changes in physiological and biochemical indicators, contents, and starch. After dehydration and ultra-low temperature storage, longan seeds almost lost the vitality. Compared with healthy seeds, dehydration led to a significant increase in malondialdehyde content and severe damage to cell membranes. The hydrogen peroxide content showed a decreasing trend. The expression of antioxidant enzyme system increased, and the highest SOD activity was observed in longan seeds with a water content of 16% after vitrification and freezing treatment, while vitrification and freezing treatment reduced the activities of POD and CAT. Low temperature and dehydration led to an increase in the content of soluble sugars and proteins in seeds, while dehydration led to protein denaturation and a decrease in content. Observing the starch of longan seeds, it was found that after vitrification and freezing treatment, there were voids and depressions on the surface of starch particles, which were directly frozen and caused starch particle rupture. Dehydration and low temperature did not affect the molecular structure of starch, but caused some degree of damage to the internal ordered structure.

收稿日期 2024-06-06; 修回日期 2024-07-15

基金项目 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (No. 2021-I2M-1-032)。

作者简介 李珊珊 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 热带药用植物资源开发与利用; *同等贡献作者: 孙 政 (1997—), 女, 学士, 科研助理, 研究方向: 顽拗性种子超低温保存。**通信作者 (Corresponding author): 曾 琳 (ZENG Lin), E-mail: zenglin00186@126.com。

Keywords: cryopreservation; physiological and biochemical characteristics; recalcitrant seeds; longan

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.12.012

龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 是无患子科龙眼属植物, 广泛分布于中国、泰国、马来西亚和越南等亚热带地区, 是我国南部和东南部地区著名的果树之一, 主要有石硖、青山、储良等品种。《本草纲目》中记载龙眼具有开胃健脾, 补虚益智的功效, 现代药理学研究发现龙眼种子含有多种生物活性化合物, 具有抗氧化、抗炎和抗癌等多种药理作用^[1-2]。龙眼种子在成熟脱落之后, 种子含有大量水分, 新陈代谢旺盛, 在适宜条件下可以迅速萌发。但龙眼种子在储存过程中, 低温和干燥均会导致种子活力降低甚至丧失, 在贮藏和胁迫环境下难以存活, 即为顽拗性种子^[3]。由于顽拗性种子对低温和干燥敏感, 传统的储存方式无法维持种子活力, 低温保存是植物物种长期保存的首选方法。已知的顽拗性种子, 如橡胶树、可可、荔枝、黄皮等^[4]种胚的寿命很短, 其种质无法通过种子库 5℃冷藏和-20℃或-80℃冷冻保存, 通过超低温保存整个种子或芽尖有助于种胚的活力保存。在超低温条件下, 长期储存的植物组织可以尽量减少细胞分裂和代谢活动, 从而达到保持植物遗传完整性的目的^[5]。玻璃化冷冻是目前植物冷冻应用最广泛的方法, 并已经成功地应用于热带和亚热带地区的物种保存^[6]。植物玻璃化保护液使细胞形成玻璃化状态, 避免冰晶产生, 从而降低细胞器结构受损的风险, 有助于植物在超低温条件下保存^[7]。目前对一些作物如马铃薯和木薯的茎尖、植被繁殖的果树和无性繁殖的草本植物和蔬菜的植物冷冻保存已经取得了许多进展。例如, PARASHER 等^[8]利用玻璃化冷冻技术冻存的濒危物种菖蒲再生率可达到 75%。然而, 关于热带顽拗性种子物种的报道较少, 为了实现顽拗性种子的超低温保存, 种子中与干燥和低温胁迫相关的生理机制备受关注。干燥和低温的恶劣环境会干扰顽拗性种子的代谢过程, 导致潜在有害的活性氧增加, 包括过氧化氢、超氧化物和羟自由基等, 有毒的活性氧可能破坏细胞膜的完整性, 或者通过氧化修饰改变蛋白质结构和活性^[9-10]。含水量低的细胞可以在超低温环境下不受损害, 但含水量高的细胞由于冰晶生长具有细胞破裂的风险。当前顽拗性种子干燥、低温不耐受的具体机制尚不清楚, 本研究以

龙眼种子为材料, 对比研究高含水量和无冰晶产生含水量龙眼种子在直接和玻璃化超低温保存方式下, 其生理生化指标、内含物和淀粉的变化, 为系统研究龙眼种子超低温保存技术提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

龙眼种子由国家南药基因资源库提供, 剥皮去果肉之后, 选取外表、大小、色泽一致, 无病虫害的种子备用。

1.2 方法

1.2.1 种子脱水和含水量测定 通过硅胶干燥法获得不同梯度含水量的龙眼种子。将种子放在盛有硅胶的干燥器中, 一定时间后取出, 剪碎后称重, 在 130℃条件下干燥至恒重后称重, 干燥前后重量差值与干燥前重量比即为种子含水量, 最后获得含水量分别为 36.78% (新鲜种子, CK)、21.17%、20.25%、19.14%、18.60%、17.20% 和 16.78% 的龙眼种子。

1.2.2 基于 DSC 的热力学分析 使用瑞士梅特勒公司的差示扫描量热仪对龙眼种子的种胚进行热力学测定, 解剖不同含水量龙眼种子的种胚称取 10 mg, 置于铝盘内密封。DSC 分析条件为 30℃保持 1 min, 以 10℃/min 降温至-80℃后保持 2 min, 再以 10℃/min 升温至 30℃; 通过分析不同含水量下种子种胚热焓值变化, 记录脱水临界含水量进行后续试验。

1.2.3 种子超低温保存 根据热力学分析结果, 分别将含水量为 36.78% 和 16.78% 的种子采用直接冷冻法和玻璃化冷冻法进行超低温保存测定。

直接冷冻法: 种子放入冻存管中, 直接投入液氮中保存。玻璃化冷冻法: 将种子置于装载液 LS (每升 MS 溶液中含 2 mol 甘油和 0.4 mol 蔗糖) 中室温处理 25 min 后, 转入玻璃化保护剂 PVS2 (每升 MS 溶液中含 30% 甘油、0.4 mol 蔗糖、15% 乙二醇和 15% 二甲亚砜) 进行 30 min 的冰水浴处理, 再换上预冷新鲜的 PVS2 后迅速投入液氮中保存。解冻程序: 取出液氮保存 24 h 后的龙眼种子, 将冻存管置于 40℃温水浴中解冻 5 min, 其中玻璃化冷冻法超低温保存的龙眼种子用 US 洗

涤溶液（每升 MS 溶液中含 1.2 mol 蔗糖）洗涤 10 min，蒸馏水清洗浸泡 3 次，每次 10 min，随后进行后续测试。

处理后的种子分别命名为：36.78% CK（36-CK）、36.78%玻璃化冷冻（36-VF）、36.78%直接冷冻（36-DF）、16.78% CK（16-CK）、16.78%玻璃化冷冻（16-VF）、16.78%直接冷冻（16-DF）。

1.2.4 种子活力和生理生化测定 龙眼种子植物脱氢酶（PDHA）活性、丙二醛（MDA）含量、超氧化物歧化酶（SOD）活性、过氧化物酶（POD）活性、过氧化氢酶（CAT）活性、过氧化氢（H₂O₂）含量、超氧阴离子、羟自由基清除能力检测均使用北京盒子生工科技有限公司试剂盒。

1.2.5 可溶性糖含量测定 可溶性糖含量通过硫酸-蒽酮法使用南京建成生物工程研究所试剂盒测定。

1.2.6 可溶性蛋白质测定 可溶性蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法，称取胚轴 0.5 g，加入 5 mL 蒸馏水机械匀浆，12 000 r/min 离心 20 min，取上清液 1 mL，加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 试剂，摇匀，2 min 后在 595 nm 波长下比色。

1.2.7 淀粉提取及结构测定 （1）龙眼种子淀粉制备。将龙眼种子剪碎，与蒸馏水按料水比 1：4 在打浆机中磨碎 10 min，重复 2 次后，浆液用 200 目尼龙网过滤。所得滤液在烧杯中静置 12 h，弃上清液收集白色沉淀，去除上方的黄色杂质，用蒸馏水反复洗涤至上清液澄清。用 NaOH 调节 pH 至 9.0，去除淀粉中的蛋白质，正己烷搅拌浸泡 24 h 去除脂质，抽滤所得淀粉并用蒸馏水反复洗涤 4~5 次，沉淀置于 45 ℃鼓风干燥箱干燥至恒定重量，粉碎过 160 目筛即得淀粉。

（2）直链淀粉含量测定。直链淀粉使用南京

建成生物工程研究所直链淀粉测试试剂盒测定。

（3）扫描电子显微镜 SEM 观察。取少量淀粉，均匀涂抹在导电双面胶上，经过喷金处理后置于扫描电子显微镜下观察，电压 5 kV，4000 倍镜下观察淀粉颗粒形貌。

（4）X 射线衍射 XRD 检测。通过 X 射线衍射分析仪检测淀粉的晶体结构，在 Cu-靶射线下，管压 40 kV，电流 40 mA，2 θ 测定范围为 3°~60°。

（5）傅里叶变换红外光谱 FTIR 测定。将淀粉和干燥 KBr 粉末混匀在玛瑙研钵内研磨，将混合物压片并在傅里叶变换光谱仪上进行观察，扫描波长为 400~4000 cm⁻¹，分辨率 4 cm⁻¹，扫描速率为 20 s/次，扫描 64 次。

1.3 数据处理

所有实验数据均做 3 次重复，用 origin 2021 和 IBM SPSS Statistics 25 软件进行数据处理和作图。

2 结果与分析

2.1 热力学特征分析

不同含水量龙眼种子的热力学性质参数差异明显，由表 1 可知，随着含水量降低，种胚的热焓值呈下降趋势，冷却结晶阶段起始温度和峰值温度代表种胚在降温过程中形成冰晶的温度，加热熔融阶段代表在升温过程中冰晶融解的温度^[11]。36-CK 龙眼种胚的冷却结晶起始温度是 -20.94 ℃，远低于冰晶融解起始温度 0.83 ℃，热焓值为 120.35 J/g，表明在原始含水量种子中，可结晶水含量高，种胚内部低温时产生的结晶多。16-CK 种胚中无结晶峰产生。随着含水量的降低，冷却结晶的温度和热焓值不断降低，说明种胚脱水后，可冰冻结晶的自由水含量下降，可以尽量降低冷冻冰晶对种胚产生的伤害。

表 1 不同含水量龙眼种子的热力学参数

Tab. 1 Thermodynamic parameters of longan seeds with different moisture content

种子含水量 Moisture content of seeds/%	冷却结晶阶段 Cooling crystallization stage			加热熔融阶段 Heating and melting stage		
	起始温度 Start temperature/℃	峰值温度 Peak temperature/℃	热焓 Enthalpy/(J·g ⁻¹)	起始温度 Start temperature/℃	峰值温度 Peak temperature/℃	热焓 Enthalpy/(J·g ⁻¹)
36.78	-20.94	-22.00	120.35	0.83	1.83	38.84
21.17	-24.90	-35.17	17.63	-23.32	-7.17	25.76
20.25	无结晶峰	无结晶峰	无结晶峰	-24.25	-11.33	8.20
19.14	无结晶峰	无结晶峰	无结晶峰	-22.67	-9.83	22.68
18.60	无结晶峰	无结晶峰	无结晶峰	-18.07	-11.50	1.82
16.78	无结晶峰	无结晶峰	无结晶峰	无结晶峰	无结晶峰	无结晶峰
16.62	无结晶峰	无结晶峰	无结晶峰	无结晶峰	无结晶峰	无结晶峰

2.2 不同处理龙眼种子活力变化

根据种胚中植物脱氢酶活性的高低可以判断种子活力的大小,如表 2 所示,36-CK 的种子植物脱氢酶活性最高,经过低温和干燥处理后,种子活力急剧下降。16-CK、16-VF 和 16-DF 的种子活力急剧下降,但 16-VF 的种子活力高于 16-CK。

2.3 不同处理龙眼种子生理生化指标变化

2.3.1 不同处理龙眼种子 MDA 和 H₂O₂ 含量变化
氧自由基主要攻击或破坏生物膜系统,氧化分解生物膜中的不饱和脂肪酸,生成脂质过氧化产物——MDA,最终造成生物膜的损伤、渗漏,甚至细胞的死亡^[12]。种子 MDA 含量与种子干燥、冷冻损伤的关系如表 2 所示。与 36-CK 龙眼种子 (99.25 nmol/g) 相比,36-VF 种子 MDA 含量为 103.91 nmol/g,只有小幅度增加;经过直接冷冻后,MDA 含量明显增加至 156.75 nmol/g。16-CK 种子 MDA 含量达到峰值 178.91 nmol/g,经冷冻处理后 MDA 含量下降,16-DF 含量与 36-CK 含量相近。说明玻璃化冷冻处理减少了氧自由基对机体造成的氧化损伤,使机体 MDA 含量降低,而种子含水量较低时,机体脂质过氧化程度较高。

过氧化氢是一种活化氧,在细胞内氧化生物大分子,会导致细胞膜受到损害。不同处理的龙眼种胚中过氧化氢含量呈波动式下降。36-CK、36-VF、36-DF 龙眼种子的 H₂O₂ 含量总体高于 16-CK、16-VF 和 16-DF 龙眼种子,其中 36-VF (13.35 μmol/g) 最低;16-VF (13.21 μmol/g) 过氧化氢含量高于 16-CK 和 16-DF。表明龙眼种子脱水后进行超低温保存能有效减少因过氧化氢造成的细胞膜损害。

2.3.2 不同处理龙眼种子抗氧化酶系统的变化

36-CK 龙眼种子 SOD 活性为 1044.56 U/g,与 16-CK 种子 (1227.14 U/g) 相近,在经过超低温保存后,SOD 活性有小幅度增加,其中 36-VF 种子活性较高。16-DF 种子 SOD 活性与 16-CK 种子较接近,而 16-VF 种子 SOD 活性直线上升,与 16-CK 种子相比,活性增长近 4 倍。说明超低温冷冻过程和种子脱水过程中膜脂过氧化反应程度较大。

与未脱水的种子 (386.67 U/g) 相比,干燥对 POD 活性的影响较小;36-DF 龙眼种子的 POD 活性大幅度上升达到 813.33 U/g;16-DF 种子 POD 活性 (453.33 U/g) 与 16-CK (426.67 U/g) 相似,但玻璃化冷冻会降低 POD 活性。说明超低温冷冻对 POD 活性影响较大,而直接冷冻能有效增加龙眼种子机体内 POD 活性。

36-CK 的种子在经过超低温保存后 CAT 活性明显下降,而含水量降低后,超低温储存的种子 CAT 活性变化趋势与 POD 相同,均是玻璃化冷冻后酶活性降低。说明相比于脱水过程,超低温冷冻过程更能影响种子氧化反应。

2.4 不同处理龙眼种子内含物含量变化

不同处理龙眼种子可溶性糖和可溶性蛋白质含量的变化如表 3 所示,与新鲜种子 (199.32 mg/g) 相比,干燥后的种子可溶性糖含量显著增加至 286.64 mg/g。玻璃化冷冻和直接冷冻均会使种子中可溶性糖含量升高,相比之下,新鲜种子直接冷冻后可溶性糖含量高于玻璃化冷冻种子;16-VF 与 16-DF 可溶性糖含量相近,在所有处理中,16-DF 种子可溶性糖含量最高,达到 320.18 mg/g。

龙眼种子干燥后,随着含水量降低,种子中可

表 2 不同处理对龙眼种子活力、生理生化指标和抗氧化酶系统的影响
Tab. 2 Effect of different treatments on vitality, physiological and biochemical indicators and antioxidant enzyme system of longan seeds

样品 Sample	植物脱氢酶活性 PDHA activity (U·g ⁻¹)	丙二醛含量 MDA content (nmol·g ⁻¹)	过氧化氢活性 H ₂ O ₂ content (μmol·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 (nmol·g ⁻¹)	过氧化氢酶活性 CAT activity (μmol·g ⁻¹)
36-CK	2937.85±249.48 ^a	99.25±6.17 ^c	23.38±3.05 ^a	1044.56±54.52 ^d	386.67±83.27 ^{bc}	21.20±0.64 ^a
36-VF	206.33±23.10 ^{bc}	103.91±7.98 ^c	13.35±2.41 ^{bc}	1843.47±38.70 ^b	240.00±40.00 ^d	11.52±5.14 ^b
36-DF	330.21±54.67 ^b	156.75±2.69 ^b	17.21±5.11 ^b	1666.45±66.63 ^{bc}	813.33±115.47 ^a	11.72±3.35 ^b
16-CK	40.33±10.84 ^c	178.91±16.83 ^a	8.49±1.69 ^{cd}	1227.14±62.52 ^{cd}	426.67±46.19 ^{bc}	24.36±4.74 ^a
16-VF	59.11±10.01 ^c	151.37±1.75 ^b	13.21±0.29 ^{bc}	5201.55±649.63 ^a	293.33±61.10 ^{cd}	14.37±2.50 ^b
16-DF	46.11±9.27 ^c	101.56±4.27 ^c	6.20±1.50 ^d	1612.85±218.89 ^{bc}	453.33±61.10 ^b	26.81±1.79 ^a

注:不同小写字母表示处理间差异显著 (P<0.05)。
Note: Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments (P<0.05).

表 3 不同处理对龙眼种子内含物的影响
Tab. 3 Effect of different treatments on the inclusion contents of longan seeds

样品 Sample	可溶性糖含量 Sugar content/(mg·g ⁻¹)	可溶性蛋白质含量 Protein content/(mg·g ⁻¹)
36-CK	199.32±12.27 ^c	94.47±0.34 ^{bc}
36-VF	233.89±9.30 ^d	99.65±1.44 ^a
36-DF	255.76±14.65 ^c	101.28±2.07 ^a
16-CK	286.64±10.51 ^b	92.65±1.71 ^{cd}
16-VF	317.08±13.16 ^a	91.05±1.22 ^d
16-DF	320.18±12.57 ^a	95.92±1.70 ^b

注：不同小写字母表示处理间差异显著（ $P<0.05$ ）。
Note: Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments ($P<0.05$).

溶性蛋白质的含量从 94.47 mg/g 降至 92.65 mg/g。36-CK 龙眼种子在经过直接冷冻（99.65 mg/g）和玻璃化冷冻（101.28 mg/g）处理后可溶性蛋白质含量均有上升；而 16-CK 种子在玻璃化冷冻后可溶性蛋白质含量无显著变化，直接冷冻处理后可溶

性蛋白质含量上升至 95.92 mg/g。
2.5 不同处理龙眼种子淀粉比较
2.5.1 不同处理龙眼种子淀粉颗粒形貌 淀粉颗粒形态是淀粉粒分析对比的重要指标^[2]。通过扫描电子显微镜观察到的龙眼种子干燥及冷冻前后淀粉的颗粒形态如图 1 所示。新鲜的龙眼种子淀粉呈椭圆形和方形，表面光滑，无明显裂隙；在经过干燥后的 16-CK 淀粉形状没有明显变化，但表面出现孔洞和凹陷。36-VF 的龙眼淀粉形态无明显变化；但 36-DF 淀粉颗粒出现凹陷和部分开裂的不规则淀粉聚集体。16-VF 的龙眼种子淀粉同样与冷冻前淀粉形态相似，均有孔洞和凹陷，表面光滑，但 16-DF 的部分淀粉维持原形态，同时观察到大量的淀粉碎片，表示在超低温环境下直接冷冻严重破坏了淀粉的颗粒结构。这可能是在低温环境的影响下，淀粉颗粒的膨胀力和压力过高导致的淀粉颗粒发生破裂。

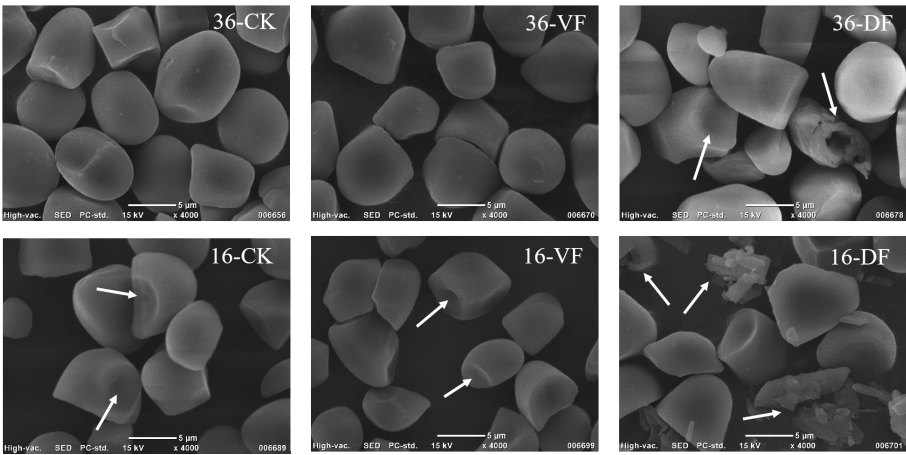


图 1 不同处理龙眼种子淀粉颗粒形貌
Fig. 1 Morphology of starch particles in different treatments of longan seeds

2.5.2 不同处理龙眼种子淀粉结晶结构和短程有序结构 淀粉颗粒由直链淀粉和支链淀粉组成，直链淀粉是多数淀粉的次要组成成分。如表 4 所示，新鲜未经过冷冻处理的龙眼种子淀粉直链淀粉含量为 22.14%，直接冷冻后直链淀粉含量 21.74%略有降低趋势。干燥后的龙眼种子在冷冻前后直链淀粉含量均低于新鲜龙眼种子淀粉，其中玻璃化冷冻后的龙眼种子直链淀粉含量最低。
龙眼淀粉的 XRD 衍射图谱如图 2 所示，龙眼种子淀粉 2θ 在 15°、23°处有强衍射峰，在 17°、18°处有典型衍射双峰，属于 A 型晶体结构。淀粉在经过干燥和冷冻处理后仍然呈现出相似的 XRD 图谱，说明淀粉的晶体结构并未发生改变。

表 4 不同处理龙眼种子淀粉的直链淀粉、XRD、FTIR 参数

Tab. 4 Amylose, XRD, FTIR parameters of longan seed starch under different treatments

样品 Sample	直链淀粉含量 Amylose content/%	晶型 Crystal form	$R_{1047/1022}$	$R_{995/1022}$
36-CK	22.14±0.53 ^{ab}	A	1.06	1.15
36-VF	22.94±0.88 ^a	A	1.05	0.97
36-DF	21.74±0.74 ^b	A	0.88	1.02
16-CK	19.99±0.86 ^c	A	0.97	1.04
16-VF	18.41±0.30 ^d	A	0.95	1.02
16-DF	19.37±0.55 ^{cd}	A	0.95	1.01

注：不同小写字母表示处理间差异显著（ $P<0.05$ ）。
Note: Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments ($P<0.05$).

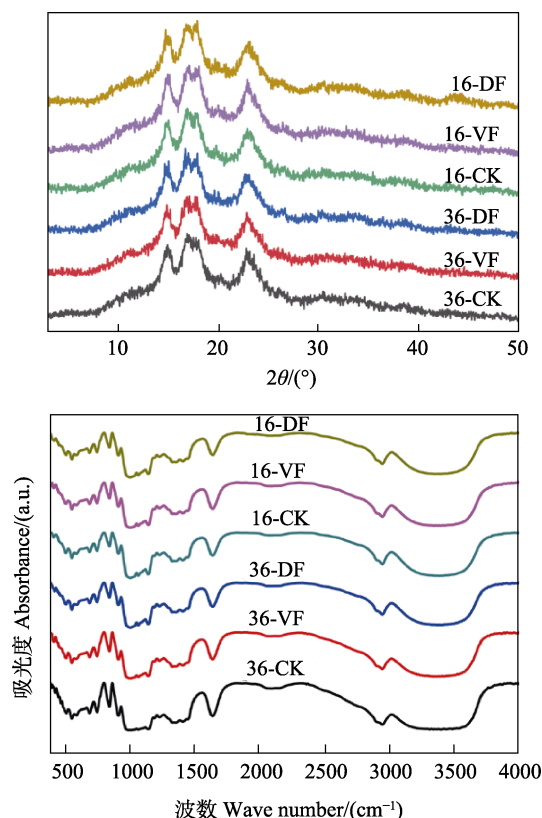


图 2 不同处理龙眼种子淀粉的 XRD 衍射图谱 (A) 和 FTIR 光谱 (B)

Fig. 2 XRD diffraction patterns (A) and FTIR spectra (B) of starch from different treatments of longan seeds

通过 FTIR 光谱及其参数可观察淀粉颗粒的短程有序结构^[13]。如图 2 所示,在 3300~4000 cm^{-1} 区域观察到由 O-H 的拉伸引起的宽带,在 800~1200 cm^{-1} 范围因 C-C、C-OH 和 C-H 拉伸振动引起了峰值变化。6 种龙眼种子淀粉分别显示出相似的 FTIR 光谱,峰的数量没有明显变化,仅观察到峰值强度的差异,表明淀粉结构相似。通过计算 1047/1022 cm^{-1} ($R_{1047/1022}$) 和 995/1022 cm^{-1} ($R_{995/1022}$) 处的吸光度比 (表 3),可揭示淀粉短程有序度和双螺旋结构的变化。 $R_{1047/1022}$ 代表了淀粉结晶区和无定形区的比值,通常用来评估淀粉分子短程有序程度。新鲜未经冷冻处理的龙眼种子淀粉 $R_{1047/1022}$ 和 $R_{995/1022}$ 值最高,分别为 1.06 和 1.15;干燥处理后吸光度比均低于新鲜种子,且玻璃化冷冻和直接冷冻处理后仍有下降趋势。表示干燥和冷冻处理破坏了淀粉链之间的结合,淀粉分子有序程度降低。

3 讨论

通过差示扫描量热法排除冰晶伤害对种胚的

影响,确定含水量为 16.78% 的种子进行后续玻璃化冷冻和直接冷冻保存并进行对比试验。龙眼种子成熟脱落后含水量高,对低温和脱水敏感,本研究通过测试种子植物脱氢酶活性判断种子活力,发现新鲜种子在经过超低温保存后,活力大幅度下降,干燥后活力几乎丧失。活性的强弱与种子自身贮藏物质和细胞系统完整性有关。

新鲜种子的含水量和代谢活性相对较高,低温和脱水可能会破坏细胞并诱导氧化和自由基生成^[14-15]。MDA 是由活性氧与组织的脂质分子反应形成的,MDA 对生物大分子有毒性,降低抗氧化酶系统活性,通常被用作细胞损伤的参考^[16]。种子的膜脂过氧化程度加深,活力降低。种子内部的新陈代谢受温度影响,低温时种子生理机能被抑制,当种子新陈代谢降低时,活性氧的产生也会随之减少^[17]。本研究中,龙眼种子干燥后,种子脱水劣变,丙二醛含量大幅度增加;但冷冻处理的龙眼种子丙二醛含量变化幅度相较之下更小,表明在超低温条件下,种子内部调节功能强。种子在受到低温胁迫时,代谢停止,呼吸减少,导致过氧化氢含量波动式下降。

种子在受到低温和脱水胁迫过程中,组织内的抗氧化酶等物质相互作用,以维持活性氧的产生和清除达到动态平衡。但过度的失水打破了顽拗性种子的稳定代谢,低温和干燥胁迫导致有害物质累计,激活种子内部抗氧化酶系统,植物细胞内抗氧化酶活性增加,保护细胞膜不受损害^[18-19]。SOD 活性在脱水种子玻璃化冷冻保存时突然增高可能与细胞保护系统启动有关,SOD 主要分解有害物质产生过氧化氢和氧气,这也解释了过氧化氢含量比干燥种子冷冻前增加的原因。POD 和 CAT 活性在玻璃化冷冻保存后降低可能是低温胁迫刺激酶活性表达,防御系统紊乱。

在种子发育过程中,淀粉、可溶性糖和可溶性蛋白质是重要的营养物质。在种子脱水过程中,可溶性糖代替水分子起到保护种子的作用,因此随着种子含水量降低,可溶性糖含量增加^[20-21]。在超低温保存过程中,可溶性糖的生成可以提高组织的耐寒性。同时,低温环境可能刺激了新的可溶性蛋白质生成,导致冷冻保存和超低温保存新鲜种子中可溶性蛋白质含量增加。干燥后的龙眼种子过度失水,蛋白质发生变性劣变,含量大幅度下降。

龙眼种子含有淀粉和其他天然成分,龙眼种

子含有高达 49.5%的淀粉,是种子主要的营养成分之一。通过扫描电镜观察到脱水造成淀粉颗粒产生孔洞和凹陷,玻璃化冷冻较好地保存了淀粉颗粒,相反,直接冷冻导致种子内淀粉颗粒破裂。脱水和超低温保存并未对淀粉晶型和分子结构造成改变,但低温对淀粉的有序结构造成了一定程度的破坏。

4 结论

本研究分析了含水量和超低温冷冻对龙眼种子生理生化特性的影响。基于差示扫描量热技术,确定龙眼种子超低温冷冻安全(无冰晶形成)含水量为 16.78%。龙眼种子在经过脱水和超低温冷冻处理后,其活力急剧下降,且脱水的影响大于低温处理;种子低含水量时,玻璃化冷冻处理的种子其活力高于对照;脱水和低温冷冻均对龙眼种子生理生化特性指标产生了不同程度的影响;低温和脱水导致种子内可溶性糖和可溶性蛋白质含量增加,但脱水导致蛋白质变性、含量降低;直接冷冻对淀粉颗粒形貌造成的影响大于玻璃化冷冻。

参考文献

- [1] JIANG G X, WEN L R, CHEN F, WU F W, LIN S, YANG B, JIANG Y M. Structural characteristics and antioxidant activities of polysaccharides from longan seed[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92(1): 758-764.
- [2] HU Z M, ZHAO L, HU Z Y. Hierarchical structure, gelatinization, and digestion characteristics of starch from longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) seeds[J]. Molecules, 2018, 23(12): 3262.
- [3] 潘丽梅, 韦树根, 何丽丽, 万凌云, 付金娥. 低温胁迫下桑寄生种子各生理指标的变化[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(10): 109-113.
PAN L M, WEI S G, HE L L, WAN L Y, FU J E. Changes of physiological indices of *Taxillus chinensis* (DC.) Danser seeds under low temperature stress[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(10): 109-113. (in Chinese)
- [4] 张俊杰, 蒋学皎, 郭庭鸿, 张建军, 赵瑞一. 顽拗性种子脱水敏感性研究进展[J]. 西北林学院学报, 2021, 36(3): 144-151.
ZHANG J J, JIANG X J, GUO T H, ZHANG J J, ZHAO R Y. Research progress on desiccation-sensitivity of recalcitrant seeds[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2021, 36(3): 144-151. (in Chinese)
- [5] WANG M R, CHEN L, SILVA J A T D, VOLK G M, WANG Q C. Cryobiotechnology of apple (*Malus* spp.): development, progress and future prospects[J]. Plant Cell Reports, 2018, 37(5): 689-709.
- [6] 韩豫, 崔雨童, 陈彧, 饶丹丹, 吴二焕. 玻璃化超低温保存对独占春原球茎生理生化特性影响[J]. 东北林业大学学报, 2024, 52(7): 8-12.
HAN Y, CUI Y T, CHEN Y, RAO D D, WU E H. Effects of vitrification cryopreservation on the physiological and biochemical characteristics of *Cymbidium eburneum* protocorms[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2024, 52(7): 8-12. (in Chinese)
- [7] ZAMECNIK J, FALTUS M, BILAVCIK A. Vitrification solutions for plant cryopreservation: modification and properties[J]. Plants (Basel), 2021, 10(12): 2623.
- [8] PARASHER K, SHARMA C, SHARMA S, SHRISHTI E Y, MUKHERJEE P. Cryopreservation and assessment of genetic fidelity *Acorus calamus* Linn., an endangered medicinal plant[J]. Cryo Letters, 2024, 45(2): 122-133.
- [9] ROACH T, IVANOVA M, BECKETT R P, MINIBAYEVA F V, GREEN I, PRITCHARD H W, KRANNER I. An oxidative burst of superoxide in embryonic axes of recalcitrant sweet chestnut seeds as induced by excision and desiccation[J]. Physiol Plant, 2010, 133(2): 131-139.
- [10] AHMAD P, JALEEL C A, SALEM M A, NABI G, SHARMA S. Roles of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2010, 30(3): 161-175.
- [11] 韩彪, 李文清, 郭素娟, 陆璐, 解孝满. 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 B, LI W Q, GUO S J, LU L, XIE X M. 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. (in Chinese)
- [12] 魏杰, 班艳丽, 王媛, 赵文, 谢玺, 李培培. 环境胁迫对西藏拟蚤 SOD、CAT 活性和 MDA 含量的影响[J]. 生物学杂志, 2017, 34(3): 42-46.
WEI J, BAN Y L, WANG Y, ZHAO W, XIE X, LI P P. Effects of environmental stress on activity of SOD, CAT and MDA content in *Daphniopsis tibetana* Sars[J]. Journal of Biology, 2017, 34(3): 42-46. (in Chinese)
- [13] LI C, DHITAL S, GILBERT R G, GIDLEY M J. High-amylose wheat starch: structural basis for water absorption and pasting properties[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 245: 116557.
- [14] KORGE P, CALMETTES G, WEISS J N. Increased reactive oxygen species production during reductive stress: the roles

- of mitochondrial glutathione and thioredoxin reductases[J]. Biochimica ET Biophysica Acta, 2015, 1847(6-7): 514-525.
- [15] LEPRINCE O, HARREN F J M, BUITINK J, ALBERDA M, HOEKSTRA F A. Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles[J]. Plant Physiology, 2000, 122(2): 597-608.
- [16] SONG Q S, BERJAK P, PAMMENTER N. Desiccation sensitivity of trichilia dregeana axes and antioxidant role of ascorbic acid[J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(7): 803-810.
- [17] 李庆民, 朱跃斌. 低温冷害对玉米生理过程的影响[J]. 民营科技, 2011(3): 123.
- LI Q M, ZHU Y B. The effect of low temperature cold damage on the physiological processes of corn[J]. Private Technology, 2011(3): 123. (in Chinese)
- [18] PAMMENTER P B W. From avicennia to zizania: seed recalcitrance in perspective[J]. Annals of Botany, 2008, 101(2): 213-228.
- [19] WOODENBERG W R, PAMMENTER N W, FARRANT J M, DRIOUICH A, BERJAK P. Embryo cell wall properties in relation to development and desiccation in the recalcitrant-seeded *Encephalartos natalensis* (Zamiaceae) dyer and verdoorn[J]. Protoplasma, 2015, 252(1): 245-258.
- [20] GOLOVINA E, GOLOVIN A, FALLER R. Molecular modeling of membrane interactions with trehalose—a molecular view on the water replacement hypothesis[J]. Biophysical Journal, 2011, 100(3): 490a.
- [21] 李永红, 马颖敏, 许柏球, 赵梁军. 馬拉巴栗种子发育中可溶性糖变化与种子脱水耐性的关系[J]. 中国农业科学, 2009, 42(8): 2882-2891.
- LI Y H, MA Y M, XU B Q, ZHAO L J. Relationship between dehydration tolerance and soluble sugars during seed development of *Pachira macrocarpa*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(8): 2882-2891. (in Chinese)