

吴凌云,姚东伟,李明,等.种子无氧贮藏方法的建立[J].上海农业学报,2021,37(3):69-73.

种子无氧贮藏方法的建立

吴凌云^{1,2},姚东伟¹,李明¹,GROOT Steven P. C.^{2*}

(¹上海市农业科学院设施园艺研究所,上海市设施园艺技术重点实验室,上海201403;²瓦赫宁根大学与研究中心,瓦赫宁根植物研究所,瓦赫宁根6700 AA)

摘要:以胡萝卜种子为试材,研究加入脱氧剂、充氮气和真空包装3种方法对种子贮藏环境中氧气水平、相对湿度及种子水活度的影响。结果表明:真空包装不改变种子水活度,但不能创建无氧贮藏环境;以0.5 L/min流速充氮气120 s或使用含有增湿剂的铁粉脱氧剂可建立种子无氧贮藏环境。充氮气后,种子水活度略微减少;含有增湿剂的脱氧剂去除贮藏环境中氧气效果最好,但是增加了种子水活度;加入一定量的干燥剂可避免种子水活度的增加,加入一定量与种子同样相对湿度(RH)的缓冲硅胶可保持种子水活度。

关键词:无氧;种子寿命;种子贮藏;水活度

中图分类号:S339.32 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-3924(2021)03-069-05

Establishment of anaerobic method for seeds

WU Lingyun^{1,2}, YAO Dongwei¹, LI Ming¹, GROOT Steven P. C.^{2*}

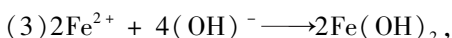
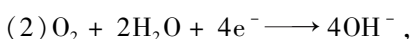
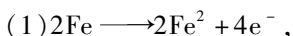
(¹Shanghai Key Lab of Protected Horticultural Technology, Horticultural Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; ²Wageningen Plant Research, Wageningen University & Research, Wageningen 6700 AA, Netherlands)

Abstract: The effects of using oxygen absorbers, flushing with nitrogen gas or vacuum packing on oxygen levels, relative humidity or seed water activity in seed storage container were studied using carrot seeds. The results showed: vacuum packing treatment had no effect on seed water activity and could not create anoxia conditions; Flushing with nitrogen gas 120 s at 0.5 L/min flow rate or using of iron based oxygen absorbers with moisturiser 24—50 h resulted in an anoxia environment. Flushing with nitrogen gas slightly reduced the seed water activity. When testing oxygen absorbers, only iron based absorbers with the inclusion of a moisturiser were shown to be effective. An increase in seed water activity due to the moisturiser could be prevented by adding a calculated amount of moisture absorbent in the container. Adding a buffer of silica gel, equilibrated at the same RH as the seeds, could maintain water activity.

Key words: Anoxia; Seed longevity; Seed storage; Water activity

种质库中种子生活力保持非常重要^[1]。种子寿命主要受其本身的遗传特性、初始种子质量及贮藏环境等因素的影响。温度和种子水活度是影响种子老化的主要因素^[2-6]。自1960年来,尽管很多研究表明无氧或低氧贮藏可以延长种子寿命^[7-13],但关于种子无氧或低氧贮藏环境的建立方法却鲜有报道。

脱氧剂作为添加剂,已在食品行业中广泛应用^[14]。绝大多数脱氧剂是依靠其中的铁粉的氧化达到去除氧气的目的^[15],其化学反应如下:

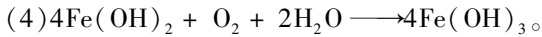


收稿日期:2019-12-24

基金项目:上海市科技兴农重点攻关项目[沪农科攻字(2016)第6-1-5号]

作者简介:吴凌云(1978—),女,硕士,副研究员,主要从事种子处理技术研究。E-mail:wulingyun@saas.sh.cn, Tel:021-52210383

*通信作者, E-mail: steven.groot@wur.nl



反应式中的水通常来源于所贮藏的食品。当贮藏干物质时,则需要在加入铁粉的同时加入增湿剂,2015年 Groot 等^[13]应用脱氧剂 Ageless ZPT[®](具有增湿剂)和干燥珠 zeolite seed Drying Beads[®]贮藏引发并丸粒化的芹菜种子,提高了引发的芹菜种子的生活力,即能在 35 °C 时贮藏 17 d 以上。充氮气是指种子包装中充入高压氮气,以替换种子包装中的空气。真空包装常用于基因库种子的长期贮藏,其优点是体积小,易于检查其密封性。

水活度即平衡相对湿度(equilibrium relative humidity, ERH),是指在相同温度下,样品的蒸汽压(p)与纯水的蒸汽压(p_0)的比值^[16]。种子水活度(a_w)是指种子中可发生水合作用的水分的量,即游离水的含量,能精确反映不同类型的种子(粉质种子、蛋白质种子和油质种子)中的水分状态。本试验通过研究加入脱氧剂、充氮气和真空包装三种方法对种子贮藏环境中氧气水平、相对湿度及种子水活度的影响,旨在为种子无氧或低氧贮藏技术的研究和应用提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

胡萝卜种子(Daucuscarota L.),荷兰 bejo 种子有限公司提供。

水活度仪(HygroLab Bench Top Indicator version 4,瑞士 Rotronic 公司),溶氧仪(Fibox 3 LCD trace fiber optic oxygen transmitter,德国 PreSens 公司),温湿度记录仪(EasyLog EL-USB-2,英国 Lascar 公司)

1.2 充氮气试验

分别取 1 g、5 g、25 g 30% 相对湿度下平衡的种子及 9 个纸袋(0.2 g 种子/纸袋),放置于 194 mL 带盖玻璃瓶中并密闭。1 h 后,打开玻璃瓶取出种子测定 a_w 。测完后,立即将种子放回玻璃瓶,并用带孔的瓶盖盖紧,然后以 0.5 L/min 流速分别往玻璃瓶中充入氮气 30 s、60 s、90 s、105 s、120 s,充气完成后,瓶盖立即用铝箔胶带封严。以不充氮气的玻璃瓶作为对照。1 h 后测定玻璃瓶中的氧气含量。3 d 后打开玻璃瓶,测定种子 a_w 。重复 3 次。

1.3 真空包装试验

取 1 g 30% 相对湿度下平衡的种子,测定其 a_w 后装入铝箔袋中,并使用真空密封机进行真空密封。密闭玻璃瓶中样品为对照。3 d 后测定种子 a_w 。重复 3 次。

1.4 脱氧剂试验

1.4.1 4 种脱氧剂去氧效果测定

称取 4 份 1 g 30% 相对湿度下平衡的种子,分别置于 194 mL 贮藏瓶中。向贮藏瓶中分别加入脱氧剂(表 1),对照瓶不加脱氧剂,立即拧紧瓶盖。分别于 0 d、24 d、50 d、99 d、191 d 后测定贮藏瓶中氧气含量,记录试验期间贮藏瓶内相对湿度。

表 1 脱氧剂特性
Table 1 Characteristics of the oxygen absorbers

名称	成份	脱氧量/mL	供应商
Mitsubishi Ageless FX-50L [®]	铁粉	50	日本三菱萨斯化学株式会社
Mitsubishi Ageless Z-50PKC [®]	铁粉,增湿剂	50	日本三菱萨斯化学株式会社
Mitsubishi Ageless ZPT-50MBC [®]	铁粉,增湿剂	50	日本三菱萨斯化学株式会社
Wonderkeep RP-100	铁粉,增湿剂	100	泰国 Janjaras 化学有限公司

1.4.2 硅胶吸附和解吸曲线绘制

硅胶的吸附曲线测定:将 2 kg NaCl 和 500 mL 水混匀后放置于带盖的塑料盒子(长 40 cm,宽 20 cm,高 30 cm),盒子顶部装有两个 5 V 风扇,塑料盒盖四周密封,放置于 20 °C 恒温间。放置 12 个装有 20 g 完全干燥硅胶的小培养皿(直径 5.3 cm,高度 1.3 cm)于塑料盒内。0 h、6 h、10 h、24 h、48 h、72 h、98 h、124 h、144 h、168 h、192 h、220 h 后各取出 1 培养皿硅胶,放入 127 mL 玻璃瓶并立即密闭。测定硅胶的水份含量和水活度,重复 3 次。

硅胶解析曲线测定:将 2 kg NaCl 和 500 mL 水混匀后放置于上述带盖的塑料盒子内,放置 11 个装有 20 g 硅胶的培养皿在塑料盒子里,平衡 6 d。往塑料盒子内放入 500 g 干燥珠,随后每天加入 50 g 干燥珠,

0 h、5 h、10 h、24 h、48 h、72 h、96 h、103 h、146 h、168 h、193 h 后分别从塑料盒内取出 1 培养皿硅胶,放入 127 mL 玻璃瓶并立即密封。测定硅胶的水份含量和水活度,重复 3 次。

1.4.3 Wonderkeep RP-100 脱氧剂去除氧气过程中释放的水份测量

精确称量 5 g zeolite seed Drying Beads[®]干燥珠,连同 1 包 Wonderkeep RP-100 脱氧剂放置于 194 mL 玻璃瓶中,盖紧瓶盖。以不加脱氧剂,仅加入 5 g 干燥珠的处理为对照。10 d 后分别测量加入脱氧剂和未加入脱氧剂的贮藏瓶中干燥珠的重量,两者差即为 Wonderkeep RP-100 脱氧剂去除氧气过程中释放的水份。重复 5 次。

1.4.4 Wonderkeep RP-100 脱氧剂和硅胶去氧系统测试

设置 3 个处理:(1)1 包 Wonderkeep RP-100 脱氧剂 + 0.7 g 干燥硅胶;(2)1 包 Wonderkeep RP-100 脱氧剂 + 0.7 g 干燥硅胶 + 1 g 种子(30% 相对湿度);(3)1 包 Wonderkeep RP-100 脱氧剂 + 0.7 g 干燥硅胶 + 1 g 种子(30% 相对湿度) + 20 g 30% 相对湿度下平衡的硅胶,将上述 3 个处理分别加入 194 mL 贮藏瓶中,密闭。0 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、24 h 后分别测定玻璃瓶中氧气含量,3 d 后结束试验,记录相对湿度和温度变化情况。

2 结果与分析

2.1 充氮气

经过 120 s 充氮气后,所有处理的玻璃瓶中氧气含量为 0(图 1)。3 d 后,种子水活度较充氮气前下降 0.01—0.03,表明充高压氮气对种子样品有干燥作用。

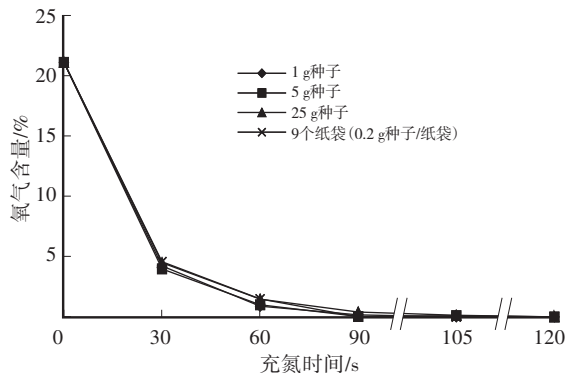


图 1 充氮气时间对装有不同数量种子的玻璃瓶中氧气含量的影响

Fig. 1 Effect of flushing time with nitrogen gas on oxygen levels in glass jars containing different amount of seeds

2.2 抽真空

抽真空处理不改变种子的水活度,但不能完全去除包装中氧气,这可能是由于种子间存在间隙所致。

2.3 4 种脱氧剂去氧效果

未加入脱氧剂的玻璃瓶,氧气含量几乎不变(图 2A)。加入脱氧剂 Ageless FX-50L 4 d 后,玻璃瓶中氧气含量仅降低了 5.9%,之后几乎不再下降。加入 Ageless ZPT-50MBC 和 Wonderkeep RP-100 24 h 后玻

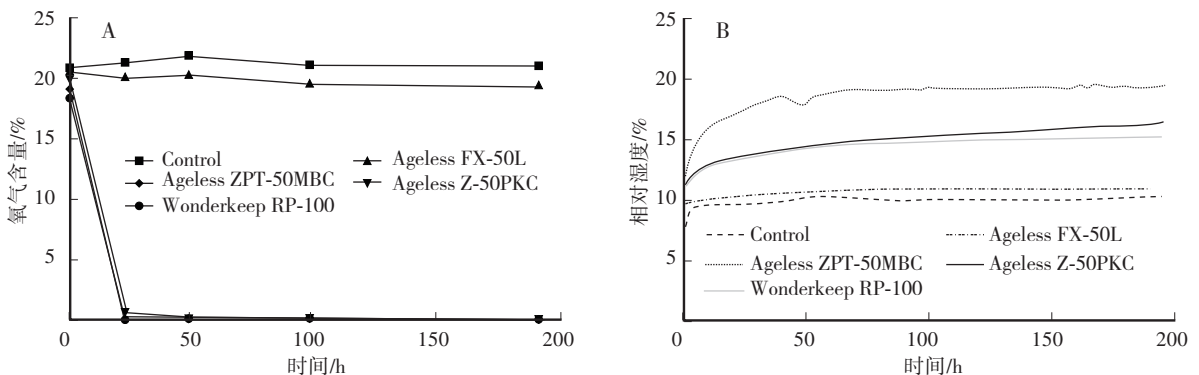


图 2 加入 4 种脱氧剂后密闭的玻璃瓶中氧气含量和相对湿度变化

Fig. 2 Evolution of oxygen levels and relative humidity in closed glass jars with 4 different oxygen absorbers

璃瓶中氧气含量为0。加入 Ageless Z-50PKC 50 h 后玻璃瓶中的氧气含量为0。这3种脱氧剂(包含增湿剂)都能有效去除玻璃瓶中氧气,但同时,玻璃瓶中相对湿度大幅增加。含有 Ageless FX-50L 脱氧剂的玻璃瓶中相对湿度变化不大(图2B)。

2.4 Wonderkeep RP-100 脱氧剂释放水份的去除

加入脱氧剂后,要保持种子 a_w 不变,需要去除脱氧剂吸收氧气过程中释放的水份。经测定,每包 Wonderkeep RP-100 脱氧剂去除氧气过程中释放的水份量为 126 mg ($n=5, SE=3$ mg)。

根据贮藏中种子所需达到的目标 a_w 计算吸收脱氧剂释放的水分所需干燥硅胶的量。当种子 $a_w < 0.4$ 时,硅胶吸附和解吸曲线一致。而当种子 $0.4 < a_w < 0.55$ 时,存在吸附滞后效应(图3)。经计算,30% 相对湿度下,吸收 126 mg 水所需干燥硅胶 0.7 g。

2.5 Wonderkeep RP-100 脱氧剂和硅胶去氧系统测试

将脱氧剂、硅胶、种子和温湿度仪按 1.4.4 方法加入 194 mL 贮藏瓶中后密闭,24 h 后,贮藏瓶中氧气含量均为0,干燥硅胶的加入不影响脱氧剂去除氧气(图4A)。脱氧剂+干燥硅胶以及脱氧剂+干燥硅胶+种子两个处理,贮藏瓶中的相对湿度开始时下降,之后缓慢增加。20 g 缓冲硅胶的加入使贮藏瓶中相对湿度保持稳定(图4B)。加入脱氧剂的贮藏瓶中温度基本保持在 20 °C(图4C)。

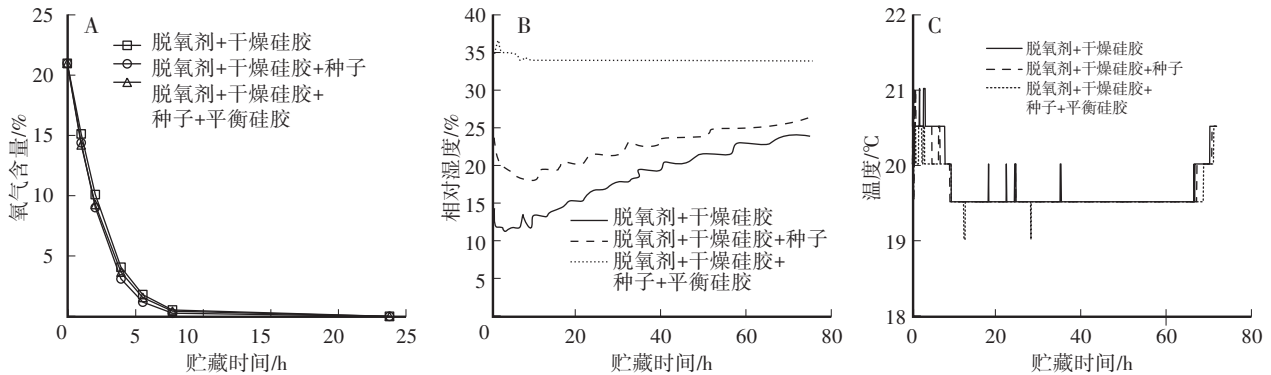


图4 加入 Wonderkeep RP-100 脱氧剂后密闭玻璃瓶中氧气含量、相对湿度和温度变化

Fig.4 Oxygen depletion, evolution of the RH and temperature in closed glass jars with a Wonderkeep RP-100 oxygen absorber

3 讨论与结论

充氮气可以完全去除贮藏容器内氧气,其优点是可以监测贮藏瓶中氧气浓度,通过控制通气时间长短建立不同氧气含量的贮藏环境。其缺点是会干燥种子,尤其对少量种子的贮藏有影响,但添加足量的平衡硅胶可使种子 a_w 保持不变。铝箔袋真空包装节省劳力和空间,且不影响种子 a_w ,但是不能完全去除包装内的所有氧气。残留氧气的量,取决于设备的真空度以及种子之间空隙,残留的氧气最终会被种子缓慢吸收^[13]。但由于铝箔袋是不透明的,氧气吸收速率无法监测。

选择适合的脱氧剂可以快速建立无氧贮藏环境。本研究发现,3种含增湿剂的脱氧剂去除氧气后增加了种子水活度。这与食品工业中推荐的当环境中 RH 低于 75% 时,使用脱氧剂需要加入增湿剂一致^[17]。

沸石干燥珠和干燥硅胶都可以作为干燥剂^[18-19]。仅使用脱氧剂和少量干燥剂无法建立一个精准的 RH 调节系统,本研究在贮藏容器内同时加入干燥硅胶和平衡硅胶,干燥硅胶用于吸收脱氧剂去除氧气过程中释放的水份;一定相对湿度下平衡的硅胶能使一定空间内的相对湿度保持相对恒定。如果容器中加入足量的平衡硅胶,可起到调节贮藏环境中相对湿度的作用。

使用含增湿剂的铁粉脱氧剂或充氮气可快速有效地创建种子无氧贮藏环境,通过添加一定数量的干燥硅胶吸收脱氧剂释放的水分可保持期望的种子水活度。针对少量种子的贮藏,可以添加足量平衡硅胶来调节种子 a_w 。应用脱氧剂和充氮气对不同作物种子贮藏性能的影响有待进一步研究。

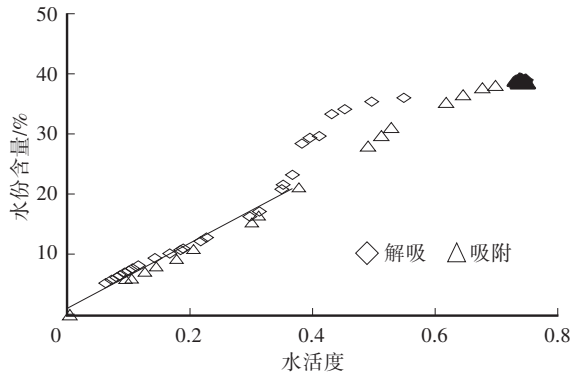


图3 硅胶水活度和水份含量对应关系

Fig.3 Relationship between water activity and moisture content of silica gel samples

参 考 文 献

- [1] 卢新雄,辛霞,尹广鹄,等. 中国作物种质资源安全保存理论与实践[J]. 植物遗传资源学报,2019,20(1):1-10.
- [2] FAO. Genebank standards for plant genetic resources for food and agriculture[M]. Rome: Food and agriculture organization of the United Nations,2013.
- [3] BEWLEY J D,BRADFORD K J,HILHORST H W M, et al. Seeds: Physiology of development, germination and dormancy[M]. 3rd edition. London: Springer,2013.
- [4] DICKIE J B,ELLIS R H,KRAAK H L, et al. Temperature and seed storage longevity[J]. Annals of Botany,1990,65(2):197-204.
- [5] NAGEL M,BÖRNER A. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions[J]. Seed Science Research,2010,20(1):1-12.
- [6] 宋超,辛霞,陈晓玲,等. 三种保存条件下水稻和小麦种质资源安全保存期的分析[J]. 植物遗传资源学报,2014,15(4):685-691.
- [7] ROBERTS E H. The viability of rice seed in relation to temperature, moisture content, and gaseous environment[J]. Annals of Botany,1961,25(3):381-390.
- [8] IBRAHIM A E,ROBERTS E H. Viability of lettuce seeds[J]. Journal of Experimental Botany,1983,34(5):620-630.
- [9] SHRESTHA K B. Effect of storage atmosphere on seed viability and vigour in *Pinus radiata* D. Don[J], Australian forestry, 1989,52(3): 229-230.
- [10] HENDRY G A F. Oxygen, free radical processes and seed longevity[J]. Seed Science Research,1993,3(3):141-153.
- [11] BARZALI M,LOHWASSER U,NIEDZIELSKI M, et al. Effects of different temperatures and atmospheres on seed and seedling traits in a long-term storage experiment on rye(*Secale cereale* L.)[J]. Seed Science and Technology,2005,33(3):713-721.
- [12] SCHWEMBER A R,BRADFORD K J. Oxygen interacts with priming, moisture content and temperature to affect the longevity of lettuce and onion seeds[J]. Seed Science Research,2011,21(3):175-185.
- [13] GROOT S P C,DE GROOT L,KODDE J, et al. Prolonging the longevity of ex situ conserved seeds by storage under anoxia[J]. Plant Genetic Resources,2015,13(1):18-26.
- [14] DAY B P F. Active packaging of food[M]//Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd,2008:1-18.
- [15] SMITH J P,RAMASWAMY H S,SIMPSON B K. Developments in food packaging technology. Part II. Storage aspects[J]. Trends in Food Science & Technology,1990,1:111-118.
- [16] 聂少勇. 水活度测定及其在制药工业的应用[J]. 中国医药工业杂志,2018,49(12):1710-1715.
- [17] VERMEIREN L,HEIRLINGS L,DEVLEIGHERE F, et al. Oxygen, ethylene and other scavengers[M]//Novel Food Packaging Techniques. Amsterdam: Elsevier,2003:22-49.
- [18] HAY F R,THAVONG P,TARIDNO P, et al. Evaluation of zeolite seed ‘Drying Beads®’ for drying rice seeds to low moisture content prior to long-term storage[J]. Seed Science and Technology,2012,40(3):374-395.
- [19] YU D,KLEIN S A,REINDL D T. An evaluation of silica gel for humidity control in display cases[J]. The western association for art conservation newsletter,2001,23(2):1-15.

(责任编辑:郭娇)