

10个牧草品种种子生物学特性和超低温处理对发芽的影响

崔程程¹,张铭佳²,赵立军¹,乔婕¹,孙华¹,咸洋¹,解孝满¹,韩彪^{1*}

(1. 暖温带林草种质资源保存与利用国家林业和草原局重点实验室,山东省林草种质资源中心,山东 济南 250000;2. 山东农业大学林学院,山东 泰安 271000)

摘要:【目的】研究10种牧草种子的生物学特性及超低温(液氮)处理后种子的发芽特性,解析超低温处理对牧草种子发芽的影响,探究牧草种子超低温处理前后热力学特征变化,为牧草种质资源的超低温保存提供技术参考。【方法】以10种牧草种子为材料,测定种子的千粒重、种长、种宽、宽长比、表面积及饱满率等生物学特性。采用减重法将种子含水量统一降至5%,测定超低温处理前后种子的发芽率。基于差示扫描量热技术,分析牧草种子的热力学特征。【结果】1) 10种牧草种子形态存在差异,由大到小为蒙燕1号燕麦、湘中多花黑麦草、科瑞茅状羊茅、吉生1号羊草、宁稷一号湖南稷子、腾格里蒙古韭、雅星假木豆、公农2号紫花苜蓿、公农沙打旺、三叶草原始群体;2) 种子的饱满率和发芽率呈正相关关系;3) 10种牧草种子经液氮超低温处理后发芽率没有下降,但生活力会降低、发芽时间更长;4) 超低温处理前后差示扫描量热技术分析显示,牧草种子的水分含量和水分状态没有发生变化。【结论】10种牧草种子的生物学特征存在差异。种子饱满率在一定程度上可作为衡量种子萌发能力的重要指标,在保存种质资源时应当注意选择饱满率高的种子。将牧草种子含水率降低到5%时,种子发芽率不会降低,基于差示扫描量热技术可知,种子超低温处理过程中水分状态不变,因此能够实现超低温保存。

关键词:牧草种子;形态特征;萌发;超低温处理;热力学分析

中图分类号:S54 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2024)04-0164-09

DOI:10.13817/j.cnki.cyycp.2024.04.018



林草种质资源是国家基础性、战略性资源,是林业生态建设、草原生态修复和现代畜牧业可持续发展的基础支撑^[1]。其中,牧草种质资源是牧草育种的基础,随着长期的历史演化,经过人工及自然选择、基因交流进化,牧草种质资源的多样性愈加丰富。我国自解放以来便对草地资源的保护利用非常重视^[2],草地

作为草食动物获取能量和营养物质的主要来源,其饲用价值对动物的营养水平、生理活动以及生产性能有直接影响^[3-4]。了解牧草种质资源的生物学特性及其保存方法,可为种质资源收集保存提供理论依据,可推动草业及畜牧业可持续发展,加快我国草原生态文明建设。

目前,虽然我国拥有丰富的草地资源,但多为未经改良的天然草地^[5],这些草地的牧草产量低、适应性差、营养价值低、保护利用不足,种质资源相对单一^[6-7]。近年来,我国畜牧业快速发展,对优质牧草的需求逐年增加,但我国优质牧草种质资源收集保存数量不足^[8],收集保存技术有待成熟,牧草产能严重不足且品质得不到保障,成为限制我国畜牧业发展的瓶颈^[9]。超低温保存被认为是长期保存植物遗传资源的理想策略,过去几十年取得了重大进展,成功地实现

收稿日期:2023-03-23;**修回日期:**2024-01-16

基金资助:博士后科学基金项目“种质资源库关键技术与设备研发”(BSHCX202101);国家重要野生植物种质资源库技术支持

作者简介:崔程程(1995-),女,辽宁大连市人,硕士研究生。E-mail:cuichengcheng620@163.com

*通信作者。

E-mail:hanbiaook831228@163.com

了多种植物物种遗传资源的超低温保存^[10-11],有研究发现白三叶(*Trifolium repens*)茎尖和培养细胞可以实现超低温保存^[12]。但是牧草种子超低温保存研究相对较少,尚未建立基于超低温保存的牧草种质资源库。种子萌发是种胚从生命活动相对静止恢复到生理活跃状态的生长发育过程,也是植物生活史中对环境刺激最为敏感的阶段^[13-15]。本研究分析了10种牧草种子表型及发芽特性,确定牧草种子的生物学特性,为定向选育良种牧草提供理论参考,基于差示扫描量热技术,探索牧草种子超低温保存的可行性和技术方法,为牧草种质资源的保存与利用提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 材料

供试种子为国家林业和草原局2022年提供的草品种测试样本,分别为公农2号紫花苜蓿(*Medicago sativa*)、公农沙打旺(*Astragalus adsurgens*)、三叶草原始群体(*Trifolium repens*)、雅星假木豆(*Dendrolobium triangulare*)、宁稷一号湖南稷子(*Panicum intortum*)、蒙燕1号燕麦(*Avena sativa*)、科瑞苇状羊茅(*Festuca atundinacea*)、湘中多花黑麦草(*Lolium multiflorum*)、吉生1号羊草(*Leymus chinensis*)、腾格里蒙古韭(*Allium mongolicum*)等10种,依次缩写为ZHMX、SDW、SYC、JMD、HNJZ、YM、WZYM、HMC、YC、MGJ(下同)。以上种子置于“双十五”干燥间(15℃,15%RH)保存并于2022年4月开始试验。

1.2 测定指标与方法

1.2.1 种子千粒重 在“双十五”干燥间(15℃,15%RH)对种子进行彻底干燥^[16],将种子充分混合后,每种随机取50粒种子,重复3次,称取种子重量,用于千粒重计算。

1.2.2 种子形态特征 每种牧草种子随机选取60粒发育良好的种子,20粒种子一组,重复3次,利用种子扫描仪测量种长、种宽、宽长比、表面积等形态指标,详细试验步骤参照韩彪等^[17]种子形态特征测定方法。

1.2.3 种子饱满度 每种牧草种子取20粒摆放在培养皿上,利用种子检验X光机检验种子内部情况,根据图像结果判断种子饱满比率并分析数据。

1.2.4 种子初始含水量 参考国际种子检验协会(ISTA)种子含水量测定方法^[18],测定种子鲜重,放入

103℃烘箱,烘干17h后测定干重,3次重复,每个重复20粒种子。计算公式为:

$$\text{初始含水量} = (\text{种子鲜重} - \text{种子干重}) / \text{种子鲜重} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.5 种子超低温处理及种子萌发 采用减重法将籽粒饱满、大小均一种子含水率统一降至5%,将种子放入盛有硅胶的双层密封袋中,期间不断称重,直达目标重量。计算公式为:

$$\text{目标含水量} = 100\% - [\text{最初重量}(100\% - \text{初始含水量})] / \text{最后重量} \quad (2)$$

将10种5%含水量的牧草种子,分别放入2mL冻存管中,将冻存管固定在支架上,快速放入生物样品液氮罐中。上述种子在液氮中处理24h后取出室温下解冻^[19],将解冻后的种子放入垫有一层滤纸的直径为9cm塑料培养皿中,萌发条件见表1,每组设置3个重复,每个重复50粒种子。在黑暗条件下萌发,每日观察种子的萌发情况,根据实际情况适时地给种子更换萌发基质(表1),以胚根突破种子露白作为种子萌发的标志^[20]。以相同含水率条件下不经过超低温处理的种子为对照,分析超低温对种子萌发特性的影响。

根据《中华人民共和国国家标准草种子检验规程发芽试验》^[21]进行萌发试验,不同牧草种子萌发条件不同(表1):

种子发芽率、发芽指数和平均发芽时间的计算公式如下:

$$\text{发芽率} = (\text{发芽种子粒数} / \text{供试验种子数}) \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{发芽指数} = \sum \frac{n_g}{t_g} \quad (4)$$

$$\text{平均发芽时间} = \frac{\sum n_g \times t_g}{\sum n_g} \quad (5)$$

式中: t_g 表示发芽后经历 g 天; n_g 为发芽后第 g 天种子发芽粒数。

热力学特征测定:使用差示扫描量热仪测定超低温处理前后种子的热力学特征,将不同品种的种子样品置于铝盘内密封,在微量天平上称质量;差示扫描量热分析条件为30℃保持1min,以10℃/min降温至-150℃后保持2min,再以10℃/min升温至20℃,保持1min。每个处理3次重复。

表1 10种牧草种子的萌发条件

Table 1 Germination conditions of 10 herbage species seeds

| 种名 | 预处理 | 萌发基质 | 温度/°C | 观察天数/d | 备注 |
|------|--------------|------------|---------|--------|-----------------|
| ZHMX | 5 °C, 7 d | 水 | 20 | 10 | |
| SDW | — | 水 | 20 | 14 | |
| SYC | 5 °C, 7 d | 水 | 20 | 10 | |
| JMD | 浓硫酸浸种 20 min | 水 | 20<=>30 | 10 | |
| HNJZ | — | 0.2%的硝酸钾溶液 | 15<=>30 | 28 | |
| YM | 5 °C, 7 d | 水 | 20 | 10 | 于培养皿中种子上部再盖一层滤纸 |
| WZYM | 5 °C, 7 d | 水 | 20<=>30 | 14 | |
| HMC | 5 °C, 8 d | 水 | 20<=>30 | 14 | |
| YC | — | 水 | 20<=>30 | 20 | |
| MGJ | 常温浸种 12 h | 水 | 20 | 15 | |

注:根据种子休眠破除的时间缩短或延长预处理的时间;<=>表示变温符号,表示高温8 h,低温16 h。

1.3 数据统计与分析

采用 Microsoft Excel 2016 整理数据并做相关分析,使用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件对试验数据进行单因素方差分析(对百分数进行平方根反正弦转换后再进行方差分析),当方差分析结果为显著时,采用 Duncan 法进行多重比较;使用 Sigmaplot 12.5 作图。

2 结果与分析

2.1 种子表型特征

10种牧草种子表型存在差异,由方差分析结果可知,10种牧草的种子千粒重、种子长度、种子宽度、种

子宽长比和种子表面积差异均达到极显著水平(表2)。进一步进行种子表型指标多重比较分析,结果表明,蒙燕1号燕麦种子大小和重量普遍超过其他9种种子,种子千粒重、长度、宽度和表面积均最大,分别为28.39 g、8.54 mm、2.78 mm、17.97 mm²。科瑞苇状羊茅、湘中多花黑麦草、吉生1号羊草种子除种子宽度外,种子长度、表面积次之,宁稷一号湖南稷子种子重量次之,腾格里蒙古韭种子大小和重量均大于公农2号紫花苜蓿、公农沙打旺、三叶草原始群体、雅星假木豆,三叶草原始群体种子的大小和重量均最小,分别为0.69 g、1.25 mm、1.14 mm、1.10 mm²(表3)。

表2 10种牧草表型差异显著性

Table 2 Phenotypic significance test of 10 herbage species seeds

| 表型 | 千粒重/g | 长度/mm | 宽度/mm | 长宽比 | 表面积/mm ² |
|---------|------------|----------|----------|----------|---------------------|
| 平方和 | 1 860.97 | 198.15 | 6.78 | 2.20 | 645.16 |
| 自由度(df) | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| 均方 | 206.77 | 22.02 | 0.75 | 0.24 | 71.68 |
| F值 | 9 317.34** | 829.60** | 239.70** | 745.70** | 343.35** |

注:“**”表示差异极显著。

蒙燕1号燕麦、科瑞苇状羊茅、湘中多花黑麦草、吉生1号羊草种子更细长,公农2号紫花苜蓿、公农沙打旺、三叶草原始群体、雅星假木豆、宁稷一号湖南稷子、腾格里蒙古韭种子在表观上更接近于球形。

10种牧草种子由大到小为蒙燕1号燕麦、湘中多花黑麦草、科瑞苇状羊茅、吉生1号羊草、宁稷一号湖南稷子、腾格里蒙古韭、雅星假木豆、公农2号紫花苜蓿、公农沙打旺、三叶草原始群体。

2.2 种子饱满度

利用X光检验图像分析,结果显示公农2号紫花苜蓿、公农沙打旺、三叶草原始群体、雅星假木豆、宁稷一号湖南稷子、蒙燕1号燕麦、科瑞苇状羊茅的草种子饱满率相对较高,其中三叶草原始群体、雅星假木豆、蒙燕1号燕麦种子饱满率为100%,湘中多花黑麦草、吉生1号羊草种子饱满率次之,分别为77.78%、65.56%,腾格里蒙古韭种子的饱满率最低,仅为27.77%,种子之间的饱满率相差较大(图1)。

表3 10种牧草种子表型描述性分析及多重比较

Table 3 Phenotype descriptions and multiple comparisons of 10 herbage species seeds

| 种名 | 千粒重/g | 长度/mm | 宽度/mm | 宽长比 | 表面积/mm ² |
|------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| ZHMX | 1.99±0.03 ^c | 2.07±0.01 ^c | 1.40±0.01 ^b | 0.68±0.00 ^d | 2.29±0.01 ^b |
| SDW | 1.47±0.05 ^b | 1.72±0.02 ^b | 1.41±0.03 ^b | 0.82±0.01 ^f | 1.85±0.04 ^{ab} |
| SYC | 0.69±0.02 ^a | 1.25±0.02 ^a | 1.14±0.01 ^a | 0.92±0.01 ^g | 1.10±0.02 ^a |
| JMD | 2.83±0.04 ^e | 2.34±0.04 ^c | 1.73±0.03 ^d | 0.75±0.02 ^e | 3.21±0.09 ^c |
| HNJZ | 3.68±0.06 ^f | 2.77±0.06 ^d | 2.08±0.04 ^e | 0.77±0.01 ^e | 4.11±0.14 ^d |
| YM | 28.39±0.10 ^g | 8.54±0.16 ^g | 2.78±0.07 ^f | 0.33±0.01 ^c | 17.97±0.73 ^g |
| WZYM | 2.33±0.01 ^d | 6.78±0.18 ^c | 1.52±0.02 ^c | 0.22±0.00 ^b | 7.29±0.30 ^f |
| HMC | 2.17±0.08 ^{cd} | 6.59±0.04 ^e | 1.59±0.02 ^c | 0.24±0.00 ^b | 7.83±0.11 ^f |
| YC | 2.17±0.15 ^{cd} | 7.11±0.15 ^f | 1.15±0.01 ^a | 0.16±0.00 ^a | 5.90±0.09 ^e |
| MGJ | 3.06±0.19 ^e | 2.95±0.02 ^d | 2.05±0.04 ^e | 0.70±0.01 ^d | 4.69±0.14 ^d |

注:表中数值为均值±标准误差,同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.3 种子初始含水率

10种牧草种子的初始含水率在6%~10%,三叶草原始群体含水率最高,为9.68%,腾格里蒙古韭含水率最低,为6.22%($P<0.05$),二者相差55.6%,不同草品种种子的初始含水率差异较大(图2),但含水率普遍较低。

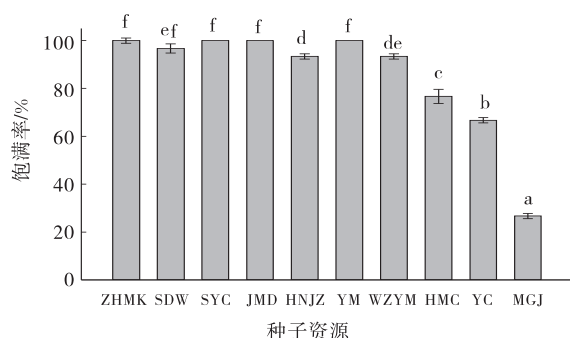


图1 10种牧草种子饱满率

Fig. 1 Seed fullness rate of 10 herbage species seeds

注:小写字母不同表示不同处理之间差异显著($P<0.05$)。

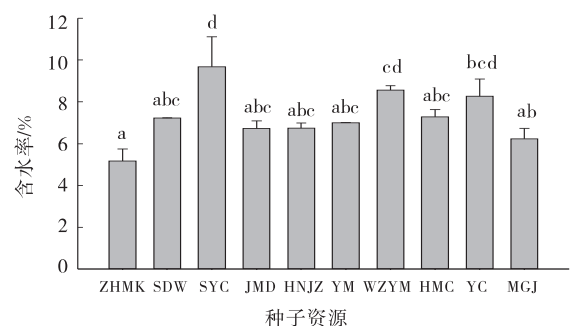


图2 10种牧草种子初始含水率

Fig. 2 Initial water content of 10 herbage species seeds

注:小写字母不同表示不同处理之间差异显著($P<0.05$)。

2.4 种子超低温处理对发芽的影响

未经超低温处理(超低温处理前)的牧草种子在适宜条件下萌发结果表明,不同牧草种子发芽特性不同(表4),蒙燕1号燕麦发芽率最高,达到了97%以上,但与发芽率同样很高的公农2号紫花苜蓿\三叶草原始群体差异不显著,而腾格里蒙古韭的发芽率相对最低,仅为15%左右,与其他9种牧草种子的发芽率均差异显著,雅星假木豆、宁稷1号湖南稷子、公农沙打旺、科瑞苇状羊茅的发芽率无显著差异,但显著高于湘中多花黑麦草和吉生1号羊草($P<0.05$)。公农沙打旺的发芽指数显著高于其他9种牧草种子的发芽指数,雅星假木豆与宁稷1号湖南稷子的发芽指数差异不显著,宁稷1号湖南稷子与蒙燕1号燕麦的发芽指数差异不显著,公农2号紫花苜蓿和三叶草原始群体的发芽指数显著高于科瑞苇状羊茅、湘中多花黑麦草、吉生1号羊草和腾格里蒙古韭的发芽指数($P<0.05$)。科瑞苇状羊茅与湘中多花黑麦草的平均发芽时间明显延长,公农2号紫花苜蓿、公农沙打旺和雅星假木豆、宁稷1号湖南稷子与蒙燕1号燕麦的平均发芽时间无显著差异,公农沙打旺的平均发芽时间显著低于三叶草原始群体的平均发芽时间,吉生1号羊草与腾格里蒙古韭的平均发芽时间没有显著差异。

种子经24h超低温处理后,公农2号紫花苜蓿、公农沙打旺、三叶草原始群体、蒙燕1号燕麦、科瑞苇状羊茅、湘中多花黑麦草、吉生1号羊草和腾格里蒙古韭的发芽率与对照(未经超低温)相比虽有上下的波动,但是超低温前后发芽率的差异并不显著;但是,雅星

假木豆在超低温保存后发芽率由90.00%显著下降到79.33%。雅星假木豆、蒙燕1号燕麦和湘中多花黑麦草在超低温保存后发芽指数分别由20.33、15.56、3.97显著下降到12.98、12.05、3.25,而平均发芽时间显著延长,分别由2.47、3.18、9.88 d增加到3.41、4.18、10.82 d,科瑞苇状羊茅在超低温保存后平均发

芽时间也显著延长,由10.81 d增加到12.44 d。宁稷1号湖南稷子在超低温保存后发芽率(84.67%增加到93.33%)、发芽指数(18.19增加到23.28)显著上升,而平均发芽时间(2.43 d下降到2.02 d)显著缩短($P < 0.05$)(表4)。

表4 10种牧草种子超低温处理前后的萌发情况

Table 4 Germination of 10 herbage species seeds before and after ultra-low temperature treatment

| 种类 | 取样时间 | 发芽率/% | 发芽指数 | 发芽时间/d |
|------|------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| ZHMX | 超低温前 | 91.97±5.02 ^{efA} | 13.92±0.61 ^{bA} | 3.35±0.03 ^{abA} |
| | 超低温后 | 89.33±1.76 ^{deA} | 13.09±0.08 ^{cdA} | 3.49±0.06 ^{bcA} |
| SDW | 超低温前 | 78.57±3.97 ^{cdA} | 23.99±2.29 ^{aA} | 2.18±0.11 ^{aA} |
| | 超低温后 | 82.00±3.06 ^{cdA} | 20.72±0.95 ^{eA} | 2.59±0.14 ^{aA} |
| SYC | 超低温前 | 94.17±1.01 ^{efA} | 12.71±0.81 ^{bA} | 3.53±0.09 ^{ba} |
| | 超低温后 | 92.67±3.53 ^{eA} | 14.22±0.44 ^{dA} | 3.34±0.05 ^{ba} |
| JMD | 超低温前 | 90.00±2.00 ^{deB} | 20.33±0.91 ^{dB} | 2.47±0.09 ^{abA} |
| | 超低温后 | 79.33±1.76 ^{cA} | 12.98±0.38 ^{cdA} | 3.41±0.05 ^{bb} |
| HNJZ | 超低温前 | 84.67±1.33 ^{cdA} | 18.19±0.23 ^{cdA} | 2.43±0.01 ^{abB} |
| | 超低温后 | 93.33±0.67 ^{eB} | 23.28±0.11 ^{fB} | 2.02±0.02 ^{aA} |
| YM | 超低温前 | 97.33±1.76 ^{fA} | 15.56±0.23 ^{bcB} | 3.18±0.03 ^{abA} |
| | 超低温后 | 98.67±0.67 ^{fA} | 12.05±0.19 ^{cA} | 4.18±0.05 ^{cb} |
| WZYM | 超低温前 | 78.00±7.02 ^{cdA} | 3.72±0.36 ^{aA} | 10.81±0.18 ^{dA} |
| | 超低温后 | 79.33±3.33 ^{cA} | 3.25±0.11 ^{bA} | 12.44±0.11 ^{fB} |
| HMC | 超低温前 | 76.67±3.33 ^{cA} | 3.97±0.15 ^{bB} | 9.88±0.05 ^{dA} |
| | 超低温后 | 68.67±2.67 ^{bA} | 3.25±0.11 ^{bA} | 10.82±0.04 ^{eB} |
| YC | 超低温前 | 42.67±2.40 ^{bA} | 4.07±0.45 ^{aA} | 6.10±0.38 ^{cA} |
| | 超低温后 | 31.33±4.37 ^{aA} | 3.13±0.64 ^{abA} | 6.13±0.66 ^{dA} |
| MGJ | 超低温前 | 15.33±3.71 ^{aA} | 2.11±1.03 ^{aA} | 6.12±1.06 ^{cA} |
| | 超低温后 | 21.33±1.76 ^{aA} | 1.91±0.18 ^{aA} | 6.70±0.35 ^{dA} |

注:表中数值为均值±标准误差,小写字母表示同列相同指标间0.05水平上的差异($P < 0.05$),大写字母表示同行处理前后0.05水平上的差异($P < 0.05$)。

2.5 超低温处理前后种子的热力学特征

10种牧草种子超低温前后热力学特征显示,种子的含水量为5%时,种子在液氮处理前后均没有出现结晶峰,种子均没有可结晶的自由水,种子不会冻伤。种子在放热和吸热过程中都没有出现明显的结晶峰,液氮冷冻不会改变种子的热力学特征,种子的水分状态不会发生变化(图3-A、图3-B)。

3 讨论

种子的生物学特征是植物长期适应自然形成的稳定结果,对植物科、属、种分类和鉴定具有重要意义^[22-23],探索种子的不同生物学特性可为种质资源收

集保存提供依据,为优异种质选育提供材料。不同类型的种子其保存方式也存在差异,例如短寿命种子宜采用试管苗保存,体积较大的种子超低温保存一般以保存胚(胚轴)为主^[19],因此种子形态特征将直接影响牧草种子的保存方式和保存容器规格。种苗的质量取决于种子的质量,种子千粒重可以直接反映种子的质量^[24]。韩彪等^[17]发现山东地区分布的三桠乌药(*Lindera obtusiloba*)种子形态特征存在显著差异。王庆华等^[25]发现6个金银忍冬(*Lonicera maackii*)天然分布区的19份种子的大小、重量均存在显著差异。本研究发现,10种牧草种子由大到小大致为蒙燕1号燕麦、湘中多花黑麦草、科瑞苇状羊茅、吉生1号羊草、宁稷

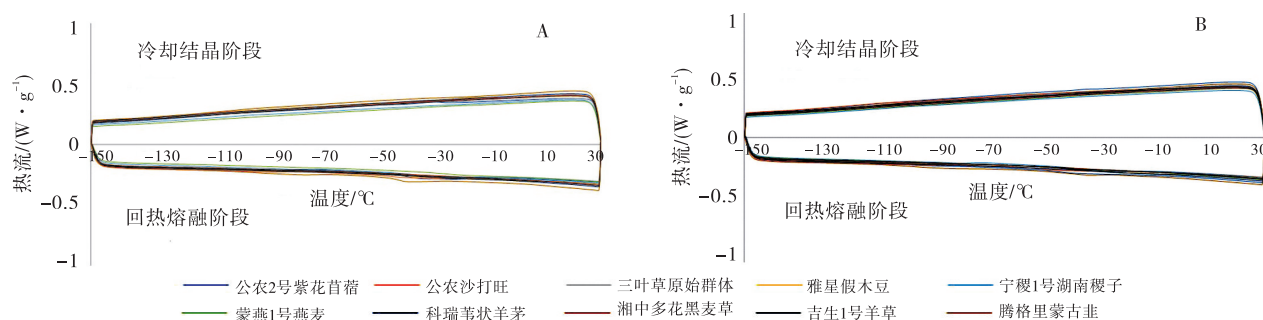


图3 10种牧草种子超低温处理前(A)和超低温处理后(B)种子热力学特征分析

Fig. 3 Thermodynamic characteristics of 10 herbage species seeds before (A) and after (B) ultra-low temperature treatment

一号湖南稷子、腾格里蒙古韭、雅星假木豆、公农2号紫花苜蓿、公农沙打旺、三叶草原始群体。植物种子在种间和种内均存在丰富的变异,这为牧草种质资源选育提供了丰富的材料。

种子萌发在植物生命周期中起关键作用^[26],种质资源保存的成败,关键在于保存种子数量是否充足及保存之后能否恢复成苗,因此测定种子饱满率和萌发率,可以为保存种子数量提供重要参考,从而更加精准的保存林草种质资源。本研究中,大部分牧草种子的发芽率、发芽指数均较高,而腾格里蒙古韭种子的发芽率、发芽指数均相对最低。这与前面的种子的饱满率的结论相印证,说明种子的饱满率在一定程度上可以作为一个表示种子能否萌发的重要指标,与金银忍冬空瘪率高决定种子品质相呼应^[25],10种牧草种子的平均发芽时间没有明显的规律,说明不同的科、属、种之间的平均发芽时间也是存在差异的。10种牧草种子之间的饱满率相差较大,在收集牧草种子资源时应当注意收集饱满率较高的种子作为保存材料,为后续科研工作提供优质种源。

全世界有96%以上的作物种质资源是以种子形式保存^[27],但保存方法各不相同。做好种质资源保护利用工作有利于农业畜牧业可持续发展^[28]。低温保存技术在众多种质资源保存方法中应用已久,如黑麦(*Secale cereale*)种子^[29]在低温保存条件下可减缓种子的退化,种子低温保存技术成为研究者关注的热点^[28]。而超低温保存一般是指在-196℃的超低温条件下使保存材料的细胞物质代谢及生长活动几乎处于停止状态,以达到长期保存材料的一门生物学技术^[30],是把离体保存与低温生物学结合的手段^[31]。超低温保存作为一种新颖的保存方法,与常规保存方法相比,保存时间长,遗传稳定性高,耗费人力、物力、财

力少,操作简便,在种质资源保存等方面有广阔的应用前景^[32]。目前在猕猴桃属(*Actinidia*)^[33-34]和葡萄属(*Vitis*)^[35-36]等经济重要果树,海南龙血树(*Dra-caena draco*)^[37]、九里香(*Murraya exotica*)^[38]等木本植物种子上应用广泛。在草本植物的利用上也成为热点,赵丹琦等^[39]对葱韭类种质资源种子进行超低温保存后发现能很好地保持原有种子的生活力,唐顺莉等^[32]发现留兰香(*Mentha spicata*)的超低温再生植株具有遗传稳定性,李贞霞等^[40]研究发现10%的种子含水量和大于30d的保存时间下南瓜(*Cucurbita mos-chata*)种子的发芽率明显提高。但是,目前对草本植物种子的研究结果没有达到成熟,还处于起步阶段。本研究中,种子经24h超低温处理后与对照(未经超低温)相比发芽率的差异并不显著,草种子含水率为5%时,液氮超低温处理不会使种子失去活性,发芽率并不会降低,出现这种结果的原因可能与种子超低温处理前后的水分状态有关;但是,雅星假木豆在超低温保存后发芽率下降,这可能与种子内部某些物质代谢有关。雅星假木豆、蒙燕1号燕麦和湘中多花黑麦草在超低温处理后发芽指数显著下降,而平均发芽时间显著延长,这说明液氮超低温处理虽然不会明显降低种子的发芽率,但种子的内部代谢活动停止后在恢复萌发时发芽力可能会有所降低、可能需要一定的复原时间。

差示扫描量热技术是分析种子水分热力学特征的有效工具。种子脱水后结晶峰的出现意味着种子内部含有可以结晶的自由水,种子被结晶冻伤^[41-43]。韩彪等^[22]基于差示扫描量热技术,结合不同含水量板栗(*Castanea mollissima*)胚轴的萌发情况研究确定了板栗种子保存的适宜含水量。本研究中,对10种牧草种子超低温前后差示扫描量热技术分析显示,种子的

含水量率为5%时,种子在液氮处理前后均没有出现结晶峰,种子均没有可结晶的自由水,种子不会冻伤。液氮冷冻不会改变种子的热力学特征,种子的水分含量和水分状态不会发生变化,而且种子的发芽率并不会明显降低,因此能够实现液氮超低温保存。

4 结论

10种牧草种子的生物学特性存在差异,由大到小为蒙燕1号燕麦、湘中多花黑麦草、科瑞苇状羊茅、吉生1号羊草、宁稷一号湖南稷子、腾格里蒙古韭、雅星假木豆、公农2号紫花苜蓿、公农沙打旺、三叶草原始群体。牧草种子在种间存在丰富的变异,为牧草种质资源选育提供丰富的材料。种子的饱满率与发芽率成正比例关系,种子的饱满率在一定程度上可以作为一个表示种子能否萌发的重要指标,为保存种子数量提供重要参考,从而更加精准的保存林草种质资源。

种子经超低温处理前后发芽率不会降低,但发芽力会降低、发芽时间更长。超低温前后差示扫描量热技术分析显示,种子的水分含量和水分状态不会发生变化,可见对于含水率5%的牧草种子来说,能够实现液氮超低温保存。

参考文献:

- [1] 董建林. 建设现代林草种业推进绿色高质量发展[J]. 北方经济, 2021(7): 20—24.
- [2] 田新春. 新疆牧草种质资源现状及保护对策[J]. 草食家畜, 2022(6): 51—55.
- [3] 申小云. 中国西南喀斯特山区草地生态畜牧业研究[M]. 兰州: 兰州大学出版社, 2011: 10—12.
- [4] 辛玉春, 张来权. 青海省天然草地营养类型[J]. 青海草业, 2011, 20(4): 27—30.
- [5] 沈海花, 朱言坤, 赵霞, 等. 中国草地资源的现状分析[J]. 科学通报, 2016, 61(2): 139—154.
- [6] 孙祥. 中国草地畜牧业的生产现状及潜力[J]. 内蒙古草业, 1997(4): 30—35.
- [7] 曹晔, 杨玉东. 论中国草地资源的现状、原因与持续利用对策[J]. 草业科学, 1999(4): 2—7.
- [8] 洪军, 陈志宏, 李新一, 等. 我国牧草种质资源收集保存现状与对策建议[J]. 中国草地学报, 2017, 39(6): 99—105.
- [9] 贾玉山, 都帅, 刘鹰昊, 等. 中国牧区饲草产品储备发展现状及展望[J]. 草业科学, 2018, 35(6): 1587—1592.
- [10] Wang M R, Bi W, Shukla M R, *et al.* Epigenetic and genetic integrity, metabolic stability, and field performance of cryopreserved plants[J]. *Plants*, 2021, 10(9): 1889.
- [11] Ren L, Wang M R, Wang Q C. ROS—induced oxidative stress in plant cryopreservation: Occurrence and alleviation[J]. *Planta*, 2021, 254(6): 1—18.
- [12] 张耀宏, 山田敏彦. 牧草类的超低温保存[J]. 国外畜牧学—草原与牧草, 1993(2): 43—45.
- [13] 巫利梅, 聂必林, 如马南木·尼合买提, 等. 混合盐碱胁迫下外源茉莉酸甲酯对黑果枸杞种子萌发特性的影响[J]. 草原与草坪, 2022, 42(6): 110—121.
- [14] Yang N, Guo X, Wu Y, *et al.* The inhibited seed germination by ABA and MeJA is associated with the disturbance of reserve utilizations in *Astragalus membranaceus* [J]. *Journal of Plant Interactions*, 2018, 13(1): 388—397.
- [15] 苗涵, 王北, 王振南, 等. NaCl 胁迫对紫花苜蓿种子萌发、幼苗生长及生理特性的影响[J]. 草原与草坪, 2021, 41(2): 100—104.
- [16] Han B, Fernandez V, Pritchard H W, *et al.* Gaseous environment modulates volatile emission and viability loss during seed artificial ageing [J]. *Planta*, 2021, 253(50): 1—16.
- [17] 韩彪, 陆璐, 咸洋, 等. 山东地区三桠乌药种子形态特征研究[J]. 安徽农学通报, 2020, 26(9): 49—50+98.
- [18] ISTA. Chapter 9: determination of moisture content. *International Rules for Seed Testing*, International Seed [S]. Testing Association, Bassersdorf, Switzerland, 2018.
- [19] 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.
- [20] 张凤娟, 李继泉, 徐兴友, 等. 环境因子对黄顶菊种子萌发的影响[J]. 生态学报, 2009, 29(4): 1947—1953.
- [21] 中华人民共和国国家市场监督管理总局. 中国国家标准化管理委员会. 草种子检验规程发芽试验: GB/T 2930. 4—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [22] 张芸香, 刘晶晶, 郭晋平, 等. 山西省文冠果种子形态特征及地理种源差异性研究[J]. 中国农学通报, 2015, 31(22): 39—45.
- [23] He Z Y, Xia W S. Nutritional composition of the kernels from *Canarium album* L. [J]. *Food Chem*, 2007, 102(3): 808—811.
- [24] 杨淼淼, 何文广, 陈文荣, 等. 江南油杉优树种子表型性状的多样性分析[J]. 福建林业科技, 2020, 47(4): 18—

- 21,30.
- [25] 王庆华,韩彪,赵立军,等.不同种源金银忍冬种子形态特征分析[J].山东林业科技,2022,52(5):74-78.
- [26] 夏方山,毛培胜,闫慧芳,等.水杨酸对植物种子及幼苗抗逆性的影响[J].草业科学,2014,31(7):1367-137.
- [27] 赵跃平,燕平梅,邢勇,等.作物种子超低温保存方法的构建[J].种子科技,2012,30(9):27-30.
- [28] 王晨,王盼,赵越,等.种子低温保存应答机制研究进展[J].特种经济动植物,2022,25(2):44-47.
- [29] Lu J, Greene S, Reid S, *et al.* Phenotypic changes and DNA methylation status in cryopreserved seeds of rye (*Secale cereale* L.) [J]. *Cryobiology*, 2018, 82: 8-14.
- [30] Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis*) by vitrification [J]. *Plant Cell Reports*, 1990, 9: 30-33.
- [31] 唐安军,龙春林.低温保存技术在顽拗性种子种质保存中的利用[J].广西植物,2007(5):759-764.
- [32] 唐顺莉,张延红,何春雨,等.留兰香超低温保存再生植株遗传稳定性研究[J].时珍国医国药,2022,33(7):1712-1715.
- [33] 白晓雪,秦红艳,韩先焱,等.软枣猕猴桃休眠芽超低温保存技术研究[J].果树学报,2020,37(8):1247.
- [34] Zhang X, Bao W, Zhang A, *et al.* Cryopreservation of shoot tips, evaluations of vegetative growth, and assessments of genetic and epigenetic changes in cryo-derived plants of *Actinidia* spp. [J]. *Cryobiology*, 2020, 94: 18.
- [35] 杨佩儒,文彬,赵焯芳.脱水速率和降温速率对葡萄柚种子超低温保存的影响[J].亚热带植物科学,2021,50(1):9.
- [36] Bettoni J C, Bonnart R, Sgepherd A N, *et al.* Modifications to a Vitis Shoot Tip Cryopreservation Procedure: Effect of Shoot Tip Size and Use of Cryoplates [J]. *Cryo-Letters*, 2019, 40(2):103.
- [37] 何柳,曾琳,顾雅坤,等.海南龙血树种子超低温保存研究[J].种子,2022,41(9):84-90.
- [38] 顾雅坤,吴怡,符丽,等.九里香种子超低温保存研究[J].植物遗传资源学报,2020,21(3):760-766.
- [39] 赵丹琦,宋江萍,贾会霞,等.葱韭类蔬菜种质资源种子超低温保存技术研究[J].植物遗传资源学报,2022,23(5):1258-1268.
- [40] 李贞霞,林紫玉,沈军,等.超低温处理对南瓜种子萌发的影响[J].西北农业学报,2009,18(4):363-366.
- [41] Hor Y L, Kim Y J, Ugap A, *et al.* Optimal hydration status for cryopreservation of intermediate oily seeds: Citrus as a case study [J]. *Annals of Botany*, 2005, 95 (7) : 1153-1161.
- [42] Nadarajan J, Mansor M, Krishnapillay B, *et al.* Applications of differential scanning calorimetry in developing cryopreservation strategies for *Parkia speciosa*, a tropical tree producing recalcitrant seeds [J]. *CryoLetters*, 2008, 29(2):95-110.
- [43] Al Z 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*, 2015, 37(1):1-10.

Biological characteristics of ten herbage species and the effects of ultra-low temperature treatment on germination

CUI Cheng-cheng¹, ZHANG Ming-jia², ZHAO Li-jun¹, QIAO Jie¹, SUN Hua¹,
XIAN Yang¹, XIE Xiao-man¹, HAN Biao^{1*}

(1. Key Laboratory of State Forestry and Grassland Administration on Conservation and Utilization of Warm Temperate Zone Forest and Grass Germplasm Resources, Shandong Provincial Center of Forest and Grass Germplasm Resources, Jinan 250000, China; 2. College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an 271000, China)

Abstract: [Objective] This study investigated the biological characteristics of seeds from ten herbage species

and examined the effects of cryopreservation(liquid nitrogen) treatment on seed germination. The goal was to analyze how cryopreservation treatment influences germination and to explore changes in the thermodynamic properties of herbage seeds before and after treatment, providing a technical reference for the cryopreservation of herbage germplasm resources. 【Method】 Seeds from ten herbage species were used to determine their biological characteristics, including thousand—seed weight, seed length, seed width, width—to—length ratio, surface area, and plumpness rate. The moisture content of the seeds was reduced to 5% using a weight reduction method. Germination rates before and after cryopreservation treatment were measured. Differential scanning calorimetry was employed to analyze the thermodynamic characteristics of the seeds. 【Result】 1) The seed morphology of the ten herbage species varied and included *Avena sativa*、*Lolium multiflorum*、*Festuca atundinacea*、*Leymus chinensis*、*Panicum intortum*、*Allium mongolicum*、*Dendrolobium triangulare*、*Medicago sativa*、*Astragalus adsurgens*、*Trifolium repens*. 2) A positive correlation was observed between seed plumpness and germination rate. 3) Germination rate of the ten herbage seeds did not decrease after cryopreservation in liquid nitrogen; however, germination ability decreased and germination time was longer. 4) Differential scanning calorimetry analysis revealed that the moisture content and water state of the herbage seeds did not change after cryopreservation treatment. 【Conclusion】 The biological characteristics of seeds from ten herbage species varied. Seed plumpness rate can be used as an important indicator of seed germination ability. For cryopreservation of herbage germplasm resources, selecting seeds with high plumpness rate is crucial. When the moisture content of seeds is reduced to 5%, germination rate remain stable. Differential scanning calorimetry indicates that the water state of seeds does not change during cryopreservation treatment, making cryopreservation feasible for herbage seeds.

Key words: herbage seed; characteristics of morphology; germination; cryopreservation treatment; thermodynamic analysis

(责任编辑 靳奇峰)