

种苗根荧光反应在多年生黑麦草与一年生黑麦草 两个种测定中可靠性验证

杨潇逸 郭雪燕 孙彦

(中国农业大学草业科学与技术学院/农业农村部牧草与草坪草种子质量测试中心(北京),北京 100193)

摘要:黑麦草属种及品种测定中常采用种苗根的荧光测定法来区分多年生黑麦草与一年生黑麦草。目前普遍认为一年生黑麦草种苗根有荧光而多年生黑麦草种苗根没有荧光。本试验使用了4个一年生黑麦草品种(安格斯1号、伯乐、牧谣、邦德)和4个多年生黑麦草品种(天使、东景、绿神、大庄园)进行种苗根的荧光测定以验证该方法的可靠性,以植株形态作为判定依据,发现4个多年生黑麦草品种分别有不同程度的荧光反应,范围为2.13%~7.97%。一年生黑麦草品种中除伯乐外均达到100%荧光率。结果表明:在种及品种测定中,种苗根的荧光测定方法只能作为鉴定一年生黑麦草与多年生黑麦草种子的参考,不能作为判定的唯一指标。

关键词:黑麦草;种苗根荧光测定;种子检验

黑麦草不仅是重要的牧草,同时在草坪上也广泛应用,主要有一年生黑麦草(*Lolium multiflorum* Lam.)和多年生黑麦草(*Lolium perenne* L.)两个种最为常用。一年生和多年生黑麦草两个草种在植株形态上有一定的差异,一般来说,一年生黑麦草植株株高较高,叶较宽;穗长,小穗多,小穗含花较多;颖片短,稃长,外稃具有芒,而多年生黑麦草外稃无芒;与多年生黑麦草相比,一年生黑麦草幼苗具有较强活力;一年生黑麦草幼叶为卷包式,多年生黑麦草为折叠式。

一年生黑麦草与多年生黑麦草的商业种子非常相似,很难用肉眼鉴别,虽然说一年生黑麦草种子有芒,而多年生黑麦草种子无芒,但是由于在收获和加工过程中种子芒容易脱落,这给种子的鉴定带来困难。由于价格上的差异,混杂后,对草种子的销售与使用等带来不必要的影响。所以如何区别一年生黑麦草与多年生黑麦草种子,防止商业销售种的混杂尤为重要。

植株鉴定方法需要时间长,往往在急需了解草种情况下无法满足需求,所以种苗根的荧光反应

(SRF, Seedling Root Fluorescence)自1928年Gentner^[1]发现以来,已作为国际和国内的标准方法被用于一年生黑麦草和多年生黑麦草草种的鉴定^[2-6],此方法需时相对短,操作简单。通常情况下,发芽试验中滤纸上生长的一年生黑麦草的幼苗根分泌生物碱annuloline^[7],在紫外线下发出荧光,多年生黑麦草幼苗不分泌生物碱因此无荧光反应。然而,有研究表明存在有荧光多年生黑麦草和无荧光一年生黑麦草^[3,8-11]。本试验旨在探究种苗根荧光测定对黑麦草种间鉴定的可靠性,以确保种子检验的正确与准确性。

1 材料与方法

1.1 材料 本试验所用种子由中国农业大学牧草种子实验室提供,包括4个一年生黑麦草品种(安格斯1号、伯乐、牧谣、邦德)及4个多年生黑麦草品种(天使、东景、绿神、大庄园)。采用直径12cm滤纸,直径12cm培养皿;LRH-250-G II光照培养箱(广东省医疗器械厂);紫外仪(北京六一仪器厂);花盆;Pindstrup substrate营养土。

1.2 试验方法

1.2.1 种子萌发 从一年生黑麦草各品种经过充分混合的种子中,取有明显芒的种子150粒。从多年生黑麦草各品种经过充分混合的种子中,随机取

基金项目:国家现代产业技术体系项目(CARS-034)

郭雪燕为共同第一作者

通信作者:孙彦

150粒种子。以50粒作为一个重复,每个品种设置3个重复。培养皿中放置3层滤纸,并用预冷的 KNO_3 润湿,避免滤纸与培养皿之间产生气泡。将种子均匀地分布在湿润的发芽床上,每粒种子间保持适当的距离,以减少相邻种子对幼苗发育的影响,并且能减少后续紫外观察种苗根的荧光的互相干扰。胚芽朝上,胚根朝下,方向一致,并留出1/3的空白方便培养时添水。

盖上培养皿盖,用橡皮筋固定,倾斜置于5~10℃下预冷7d,解除种子的休眠。之后转移到培养箱(12h黑暗20℃,8h光照30℃)中进行萌发,生长2周待根4~6cm时进行荧光鉴定。萌发期间经常检查水分、温度和通气状况,及时补充蒸馏水保持湿润。

1.2.2 荧光鉴定 将发芽后的种子置于紫外线检测器下用302nm紫外光照射,分别计数各材料根的荧光强度,用强、弱、无表示。

发芽率 = $X/150 \times 100\%$, X 为发芽种子数。

荧光率 = $(X-Z)/X \times 100\%$, Z 为正常发芽但不发光的种子。

1.2.3 种鉴定依据 将种苗根荧光检验过的幼苗从滤纸上取下,并按照荧光强度分类移栽到花盆中培养,置于温室。一年生黑麦草共550株荧光苗和1株无荧光苗移栽置花盆,多年生黑麦草共23株荧光苗和539株无荧光苗移栽置花盆。花盆基质为蛭石:营养土=1:2。培养一段时间后,通过植株形态的观察,以幼叶卷叠方式来鉴定黑麦草的种类:卷包式为一年生黑麦草,折叠式为多年生黑麦草。

2 结果与分析

2.1 荧光测定统计分析 利用上述方法,对多年生黑麦草以及一年生黑麦草各品种进行了荧光检验,结果见表1。由试验结果可得知,除伯乐外一年生黑麦草荧光率均为100%,伯乐的荧光率为99.26%,无荧光率为0.74%;各品种多年生黑麦草均有少量荧光,荧光率随品种而有所差异,本试验测定的4个品种中荧光率在2.13%~7.97%之间波动。从本试验可看出存在有荧光多年生黑麦草及无荧光一年生黑麦草。

表1 两种黑麦草草种的荧光检验结果

草种	品种名称	种子数	总发芽数(X)	发荧光种子数	发芽无荧光种子数(Z)	发芽率(%)	荧光率(%)
一年生黑麦草	安格斯	150	142	142	0	94.67	100
	邦德	150	140	140	0	93.33	100
	牧谣	150	133	133	0	88.67	100
	伯乐	150	136	135	1	89.33	99.26
多年生黑麦草	东景	150	137	3	134	91.33	2.19
	大庄园	150	146	6	140	97.33	4.11
	绿神	150	141	3	138	94.00	2.13
	天使	150	138	11	127	92.00	7.97

2.2 植株鉴定验证荧光反应 将发芽的黑麦草幼苗根据不同的荧光情况从培养皿分别移入盆栽培养一段时间后,通过植株形态观察,以幼叶卷叠方式来鉴定两种黑麦草。由表2得知,样品中一年生黑麦草幼叶全部为卷包式幼叶,说明样品全部为一年生黑麦草;而多年生黑麦草中出现两个卷包式的幼叶(冬景1个,绿神1个),说明多年生黑麦草中掺杂少量一年

生黑麦草种子。多年生黑麦草(折叠式幼叶)具荧光反应的种子数总共为19个,其中强荧光种子数11个(分别为冬景2个、大庄园4个、天使5个),而弱荧光种子数8个(大庄园2个、绿神1个、天使5个);一年生黑麦草(卷包式幼叶)的无荧光种子数为1(伯乐1个)。由此进一步证实了存在一年生无荧光的黑麦草,也存在多年生有荧光的黑麦草。

表2 两种黑麦草形态学检验结果

草种	品种名称	强荧光		弱荧光		无荧光	
		卷包式幼叶	折叠式幼叶	卷包式幼叶	折叠式幼叶	卷包式幼叶	折叠式幼叶
一年生黑麦草	安格斯1号	123	0	12	0	0	0
	邦德	129	0	7	0	0	0
	牧谣	115	0	13	0	0	0
	伯乐	112	0	14	0	1	0
多年生黑麦草	冬景	1	2	0	0	0	111
	大庄园	0	4	0	2	0	105
	绿神	1	0	0	1	0	112
	天使	0	5	0	5	0	98

各品种不同荧光情况黑麦草总数小于对应的发芽种子数,是由于部分黑麦草移栽到营养土基质后未能成活,无法进行植株形态鉴定

3 结论与讨论

国际上从1940年开始采用种苗根的荧光反应方法进行黑麦草的种间鉴定,并被国际种子检验协会(ISTA)认可^[5]。我国2017年发布的国标《草种子检验规程》也采用的是黑麦草属荧光测定^[6]。基于前人的研究结果和本试验观察到的现象,可以认为一年生和多年生黑麦草种苗根中都有可能出现荧光。种苗根的荧光测定方法不能作为区分一年生与多年生黑麦草种子的唯一指标,已成为国际社会的共识^[3,4,9,12,13],而国内却鲜见报道。

通过本试验得出一年生黑麦草荧光率除伯乐为99.26%以外,其余3种均为100%,多年生黑麦草荧光率2.13%~7.97%。综合上述分析,认为黑麦草种苗根的荧光存在一定数量的与典型特征相悖的情况,在不同品种中这一值有所不同,种苗根荧光测定可以作为测定一年生和多年生黑麦草的参考,而不能作为其种及品种鉴定的唯一指标。

参考文献

- [1] Gentner G. Über die Verwendbarkeit von ultra-violetten Strahlen bei der Samenprüfung. Praktische Blätter für Pflanzenbau und Pflanzenschutz, 1929, 6: 166-172
- [2] Copeland L O, Hardin E E. Outcrossing in ryegrasses (*Lolium*-Spp) as determined by fluorescence tests. Crop Science, 1970, 10 (3): 254-257
- [3] Nitzsche W. The inheritance of fluorescence in ryegrass (*Lolium*

Spp). Zeitschrift für Pflanzenzüchtung, 1966, 56 (1): 88-95

- [4] Rampton H H. The use of morphological characters as compared with fluorescence tests with ultra-violet light in classifying the ryegrasses (*Lolium* spp.) of western Oregon. Jour Amer Soc Agron, 1938, 30 (11): 915-922
- [5] The International Seed Testing Association (ISTA), International rules for seed testing 2019, The International Seed Testing Association, 2019: 8-26
- [6] 王彦荣. GB/T2930. 7-2017 草种子检验规程:种及品种测定. 北京: 中国标准出版社, 2017
- [7] Karimoto R S, Axelrod B, Wolinsky J, Schall E D. The structure of annuloline, a naturally occurring oxazole alkaloid. Tetrahedron Letters, 1962 (3): 83-85
- [8] Corkill L. Inheritance of fluorescence in rye-grass. Nature, 1932, 130: 134
- [9] Linehan P A, Mercer S P. Fluorescence of *lolium* seedlings in ultra-violet light. Nature, 1933, 131: 202
- [10] Linehan P A, Mercer S P. A method of distinguishing certain strains of New Zealand perennial ryegrass (*Lolium Perenne* L.): By examination of seedlings under screened ultra-violet light. Sci Proc Dublin Soc, 1931, 20 (1/7): 75-83
- [11] Floyd D J, Barker R E. Change of ryegrass seedling root fluorescence expression during three generations of seed increase. Crop Science, 2002, 42 (3): 905-911
- [12] Nyquist W E. Fluorescent perennial ryegrass. Crop Science, 1963, 3 (3): 223-226
- [13] Okora J O, Watson C E, Gourley L M, Kelth B C, Vaughan C E. Comparison of botanical characteristics and seedling root fluorescence for distinguishing Italian and perennial ryegrass. Seed Science and Technology, 1999, 27 (2): 721-730

(收稿日期: 2019-07-02)