

藜麦种子黄酮含量的快速检测技术研究

董艳辉^{1,2} 于宇凤¹ 李亚莉¹ 赵兴华¹ 王亦学¹ 任元² 王鑫^{3,4}

贺文洋⁵ 任永康⁶ 刘江¹ 曹秋芬^{1,2} 秦永军^{1,2}

(¹ 山西省农业科学院生物技术研究中心, 太原 030031; ² 农业部黄土高原作物基因资源与种质创新重点实验室,

太原 030031; ³ 山西省投资咨询与发展规划院, 太原 030013; ⁴ 山西农业大学, 太谷 030801;

⁵ 左权县园林局, 左权 032600; ⁶ 山西省农业科学院作物科学研究所, 太原 030031)

摘要: 为了研究藜麦种子黄酮含量与超微弱发光之间的关系, 本研究对筛选的 90 份藜麦材料进行了超微弱发光研究和黄酮含量测定, 通过二者的相关性分析得出藜麦种子的黄酮含量与超微弱发光值之间呈极显著负相关 ($r=-0.965, P < 0.01$), 因此利用超微弱发光值来反映藜麦种子黄酮含量高低的方法是可行的, 利用该技术可以快速、无损地对藜麦种子黄酮含量的高低进行初期筛选, 为藜麦育种工作节省大量的人力、物力, 加速育种进程。

关键词: 藜麦; 超微弱发光; 黄酮

超微弱发光 (UWL) 是生命体在进行生命活动时的一种表现形式, 与生物系统的氧化代谢、细胞分裂和死亡、病变以及生长调控等许多的基本过程有着内在的联系, 特别是与生物机体内的生化生理和病理状态密切相关, 能够灵敏地反映生物有机体的生理生化反应状态, 近年来生物超弱发光的研究已成为生物学、农学和生物物理学等学科交叉领域的新增长点。在种子品质检测各种方法中, 物理方法快速简便, 对种子无损且用种量少^[1]。它不仅对生命科学领域有重大的科学意义, 同时也在农业、医学、食品和环境科学等领域具有很广泛的应用前景^[2-4]。

作为生命过程的一个极其灵敏的指示器, UWL 在植物种子活力检测、植物抗逆性鉴定、果实品质无损检测等方面成为一种新的检测方法^[5]。但是, 有关 UWL 与植物种子品质的研究还未见报道。藜麦具有独特的、丰富全面的营养价值, 在国际市场上有着良好的知名度, 国内发展也非常迅速^[6], 其富含黄酮, 而黄酮可有效清除体内的氧自由基, 降低胆固醇; 传统方法对藜麦黄酮含量的测定耗时耗力, 给育种工作带来巨大负担, 而采用 UWL 方法进行黄

酮含量的测定快速、简单, 且对种子无损。本研究以山西省农科院生物中心本土化种植 3 年、农艺性状较好的藜麦材料为研究对象, 在进行超微弱发光研究的基础上测定其黄酮含量, 通过研究二者之间的相关性, 以期摸索出一条快速检测藜麦黄酮含量 (或者综合品质) 且不损伤样品的方法, 为藜麦育种者初期进行藜麦优良材料的筛选提供一种快速、简便的方法, 节省人力、物力, 加速藜麦育种进程。

1 材料与方法

1.1 材料 选取山西省农科院生物中心本土化种植 3 年、农艺性状较好的 3 个藜麦品种 (晋灰藜 -1、晋红藜 -1、晋黑藜 -1) 为供试材料, 2015 年在本中心实验室盆栽种植, 每个品种 30 株, 共 90 份材料, 编号 1~90。

1.2 方法

1.2.1 标准曲线的绘制 本试验以芦丁作为藜麦总黄酮含量测定的标准品。准确称取在 120℃ 干燥至恒重的芦丁标准品 10mg, 用 70% 的乙醇溶解并定容至 100mL, 使其浓度为 100 μg/mL。将芦丁溶液用 70% 的乙醇稀释成 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 μg/mL, 各取 1mL 于试管中, 加 70% 的乙醇 1mL 和 0.3mL 5% 的 NaNO₂, 混匀后放置 6min, 然后加入 0.3mL 10% 的 Al(NO₃)₃ 溶液, 摇匀后放置 6min。最后再加入 2mL 4%NaOH, 摇匀, 放置 10min。在 510nm 处测定不同浓度的标准品的

基金项目: 山西省农业科学院博士基金 (YBSJJ1611); 山西省农业科学院种业发展专项 (2016zyzx51); 农业部黄土高原作物基因资源与种质创新重点实验室建设项目; 山西省农业科学院特色农业技术攻关项目 (YGG17065)

通信作者: 秦永军

吸光值。

根据标准曲线的制作方法,以浓度(C , mg/mL)为纵坐标,吸光值(A , 510nm)为横坐标,进行线性回归得到回归方程: $C=0.1207A+0.0008$, 相关系数: $R^2=0.9998$ (图1)。

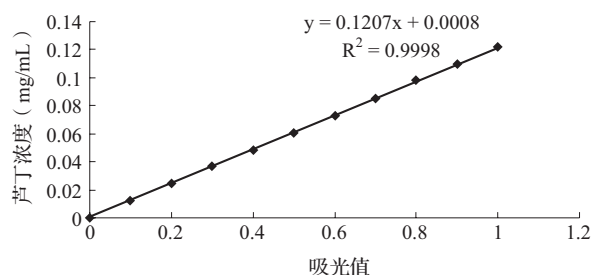


图1 芦丁标准曲线图

1.2.2 黄酮提取方法 藜麦种子黄酮的提取参考孙雪婷等^[7]的方法。每份材料称取藜麦种子 2g, 用粉碎机充分粉碎后过 0.5mm 孔筛筛选, 装入干燥器皿中备用, 分别精确称取藜麦面粉各 1g 于平底锥形瓶中(回流装置), 锥形瓶中加入 30mL 80% 的乙醇, 将锥形瓶放置于 60℃ 的水浴锅中, 浸泡提取 60min。

1.2.3 总黄酮含量测定 取 1mL 提取液于 25mL 容量瓶中, 按照标准曲线制作方法处理后用 90% 的乙醇定容至刻度。然后吸取适量黄酮提取液于石英比色杯中, 510nm 处测得吸光值 A , 计算总黄酮含量。

$$\text{藜麦面粉中黄酮化合物的含量}(\%) = \frac{C \times 25 \times 100}{W \times 100}$$

其中, W 为藜麦粉重量(g), C 为芦丁浓度(mg/g)。

1.2.4 藜麦种子的超微弱发光研究 各单株取子粒饱满的种子 300 粒, 按随机取样的方法进行顺序测定, 然后用超微弱发光仪测量其超微弱发光, 所得数据以单株为单位求平均值。

测量仪器采用中国科学院生物物理所的 BPCL-K 超微弱发光分析仪。试验前将仪器预热 1h, 使本底稳定, 灵敏度(高压)调至 -1kV, 温度控制在 $20 \pm 0.3^\circ\text{C}$, 控制周围噪音, 然后将样品置于样品室中暗适应 200s 后开始测量其自身发光强度。每次测量 100s, 间隔 5s 计数一次, 记录光子总数, 单个样品连续测量 10 次。每个样品测量前先测 1 次本底, 用 10 次测量值的平均值减本底值作为自身发光强度的测量值。

1.3 数据处理和分析 数据处理采用生物学统计软件 SPSS 18 以及数据处理绘图工程软件 Origin 8.0。

2 结果与分析

2.1 藜麦种子黄酮含量和超微弱发光综合对比 种子发出的光子数多少与种子内部的自由基浓度有关, 自由基浓度越高, 种子发出的光子数量也越多, 而黄酮具有抗氧化的功能, 能够清除自由基, 藜麦种子内生物类黄酮含量的多少与自由基的浓度有着直接的关系, 进而与藜麦种子发出的光子数量有关, 由图 2 可以直观地看出: 2 组折线的同一组 X (同一序号) 值所对应的 2 组 Y (黄酮含量、光子数) 值, 基本上都是波峰对应波谷, 即黄酮含量较高的样品其超微弱发光值低, 黄酮含量低的样品超微弱发光值较大。

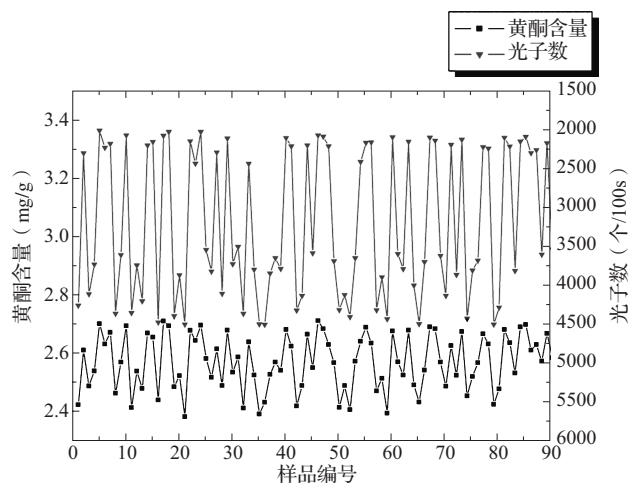


图2 藜麦种子黄酮含量与超微弱发光双坐标图

2.2 藜麦黄酮含量和超微弱发光的相关和显著性分析 生物类黄酮具有抗氧化功能, 能够有效清除体内的自由基(Free Radical)及毒素, 而自由基复合反应是超微弱发光的主要来源之一, 利用统计学规律, 对藜麦种子内生物类黄酮的含量和藜麦种子的超微弱发光(与自由基浓度正相关)进行量化分析, 对所得数据(黄酮含量、超微弱发光)进行 Pearson (皮尔生)乘积矩相关系数分析, 这是一个范围在 -1.0~1.0 之间(包括 -1.0 和 1.0 在内)的无量纲指数, 能够反映两个数据集合之间的线性相关程度。如果乘积矩相关系数 r 为正数, 则说明这两组数据集合之间是正相关, 如果乘积矩相关系数 r 为负数, 则说明这两组数据集合之间是负相关。

Pearson (皮尔生)乘积矩相关系数 r 的公式为:

$$R = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \cdot \sqrt{n \sum y^2 - (\sum y)^2}}$$

寒地水稻南繁加代与扩繁技术

黄成亮

(黑龙江省农业科学院佳木斯分院, 佳木斯 154007)

摘要:利用海南冬季温暖的气候特点,从选地、做苗床、播种、插秧及收获等方面详细的阐述了寒地水稻南繁种植技术。就整地,施肥,防螺、虫、鸟、鼠害等方面介绍了水稻田间管理技术及病虫害防治措施。

关键词:寒地水稻;南繁;技术

利用海南冬季温暖的气候条件,将农作物育种材料进行南繁加代是缩短育种年限,加速世代稳定的重要手段。海南省以其优越的气候条件,在作物育种界已成为南繁的代名词。南繁对于我国农业增产和农民增收做出了巨大贡献,在 21 世纪开展南繁工作,意义更加深远。

水稻起源于热带、亚热带地区,属短日照喜温作物,对光照、温度反应尤为敏感,由于海南岛地处热带,其冬季温暖少雨的气候条件、土壤条件、病虫害等生态环境与寒地水稻生长季节的生态环境有较大的差别,栽培方式及田间管理也与寒地有诸多不同之处,应当引起育种者重视。笔者连续几年在三亚九所、南滨农场等地进行水稻南繁,现总结南繁经验以供同行借鉴参考。

1 提早制定南繁计划

各育种单位及个人要提早制定好南繁计划,明

确南繁的材料数量、用地计划、经费预算、人员确定、行程安排等^[1]。这样可以在繁忙的收获后有目的地先整理好南繁材料,给南繁队员一定的探亲时间。要及早联系联络员做好南繁用地安排,避免临时找地给南繁工作带来的不便。

2 做好南繁种子检疫工作

水稻属于植物检疫对象,且海南具有细菌性条斑病的发生和危害,所以在南繁工作中应重视检疫工作,育种单位南繁的种子必须经过植物检疫部门检疫合格方可运往海南。在水稻南繁生育期间,有关植物检疫部门应及时监测病虫害发生发展情况,种子验收合格后方可从海南运回。

3 秧田及本田的选择

海南属于典型的亚热带季风气候,冬季高温少雨或无雨,土质以沙性土壤居多,水分蒸发快且保水、保肥差。因此,应选择地势平坦、土质肥沃、交通

其中, x 和 y 是样本平均值 $AVERAGE(array1)$ 和 $AVERAGE(array2)$ 。

对 2 组数据集进行 Pearson (皮尔生) 乘积矩相关性分析可知,二者表现出极显著的负相关性 ($P=0.01$, 相关系数 $r=-0.956^{**}$), 即藜麦黄酮含量越高,超微弱发光值越低;超微弱发光值越低,藜麦黄酮含量越高,该结果与图 2 直观结果基本一致。由此可以得出超微弱发光值可以作为反映藜麦种子黄酮含量(综合品质)的有效指标。

3 结论与讨论

黄酮能够阻断自由基链反应,因此种子黄酮类化合物的含量理论上与自由基的数量呈负相关,而

自由基的数量与发出的光子数呈正相关,因此黄酮含量应该与发出的光子数呈负相关,本研究表明:藜麦种子的黄酮含量与其超微弱发光值呈极显著负相关性,因此通过超微弱发光技术对藜麦黄酮类化合物含量进行无损检测的方法是可行的。该技术可以解决藜麦常规育种过程中对藜麦黄酮含量的检测步骤繁琐、样品量大且比较耗时等问题。目前,国内外研究者主要集中在利用该技术对种子、果实等的生命活动强弱以及种子生长发育的检测方面开展研究,对种子的品质检测方面的研究比较少,本研究发现的超微弱发光检测法可以较为准确地反映藜麦种子黄酮含量,而且检测过程迅速、简单、对种子无

便利、便于灌水和排水的地块作为秧田和本田。海南冬季用地紧张,为避免浪费,尽量选择方便机械操作的地块作秧田,便于秧苗移栽后的再利用。

4 海南冬季水稻育苗技术

4.1 确定播期 根据笔者及前人的南繁经验,正常年份寒地水稻南繁的适宜播期为11月中旬,播期过早易遭受台风和暴雨袭击,过晚播种则不能及时收获,影响后茬作物的种植,增加成本。

4.2 做苗床 有条件的育种单位可提前进行旱旋地,去除杂草且疏松土壤,泡田后耙地;待泥浆沉淀2d后,雇用当地有经验的工人用刮镢做床。在海南育苗不需要扣棚,苗床的宽度比较灵活,便于苗期管理即可,一般宽度在1.2~1.5m之间,太宽播种、除草、调查均不方便,床与床之间的间隔以方便走动为宜。在做苗床的同时可施用一些腐熟的有机肥或复合肥,复合肥一般70g/m²。苗床周围应插竹竿围塑料薄膜以防鼠害,如有鸟害出现还应罩鸟网。

4.3 播种 做完苗床应及时播种,否则苗床表面容易干燥,用泥抹抹平床面,根据种子量划好小区,将浸泡好的种子均匀播在小区内,用泥抹按压种子,使之与苗床充分接触。海南气候高温、高湿,秧苗生长很快,相同秧龄秧苗要比寒地育秧秧苗大得多,因此播种密度要比北方稀,一般密度以150g/m²为宜。

4.4 苗期管理 播种结束后要及时上水,育苗期间保持沟里有水,苗床表面湿润无明显水即可。在苗床四周老鼠出没之地撒鼠药、下鼠夹,及时修补塑料薄

膜破损之处严防鼠害。出苗后及时喷洒螺药防止螺啃食秧苗幼嫩组织,撒施呋喃丹等防治蝼蛄等地下害虫。

5 水稻田间管理

5.1 整地 寒地水稻南繁苗期控制在16~20d为宜,苗期过长秧苗素质变差,插秧后大缓苗,移栽前应及时整地。整地前应充分晒田,使土壤氧化,排出硫化氢等有毒气体。灌水泡田后使用机械耙地,充分沉淀后准备插秧。

5.2 插秧 由于海南冬季温度高,寒地水稻育苗移栽后易出现早穗现象,营养生长受影响,分蘖数较少,如需扩繁种子数量应适当增加插秧穴苗数。

5.3 施肥 海南土壤以沙性土壤居多,保水保肥性差,肥料应采取少量多次施入。底肥可在耙地前施入,施肥量根据地力确定,一般每hm²施复合肥450~750kg;缓苗后追施尿素150kg,螺药可连同返青肥一同施入;接力肥与穗粒肥应根据水稻长势适量施入,过多则导致贪青晚熟。

5.4 螺、鼠、鸟害防治 海南螺以福寿螺为主,秧田及本田应及时撒施螺药,在池埂进水口处安放铁丝网,防止螺随水流入^[2],发现螺卵及时清除。海南鼠害严重,秧田及本田应及时撒鼠药、下鼠夹、围塑料薄膜,有条件的单位可使用电猫。在水稻抽穗前应及时罩鸟网防鸟害,选择网眼小、质量轻的鸟网防鸟效果好且易操作,根据地块形状、面积选择相应尺寸的鸟网可避免浪费。

5.5 病虫害防治 细菌性条斑病是一种检疫性病

损,一定程度上满足了快速无损检测的要求,但由于超微弱发光检测技术灵敏度较高,对周围环境的要求比较高,导致精确度不高,因此在应用的过程中需要综合考虑各种因素,以保证检测结果的真实性。今后,通过进一步增加样品的数量和样品的种类对该技术进一步进行验证和完善,同时运用多种物理手段进行检测,相互补充,以达到最终结果的准确、精确,使该技术在种子品质检测领域能够广泛的应用。

参考文献

[1] 于继洲,韩红艳,郭艳,等. 种子检测技术研究进展[J]. 中国种业,

2005(2): 21-23

- [2] 李淑丽. 生物超微弱发光研究进展[J]. 激光杂志,2004(4): 4-6
- [3] 赵丹莹,生吉萍,丁洋,等. 超微弱发光用于番茄果实冷害发生程度的无损监测[J]. 光谱学与光谱分析,2010,30(9): 2493-2495
- [4] 田珊珊. 猕猴桃成熟过程中超微弱发光的研究[D]. 西安: 西北大学, 2007
- [5] 李友明. 浅析超微弱发光分析技术在农业中的应用效应[J]. 农业工程技术,2016(9): 64-65
- [6] 屈洋,王可珍,康军科. 关中西部麦茬直播藜麦栽培技术[J]. 中国种业,2016(1): 82
- [7] 孙雪婷,袁俊杰,蒋玉蓉,等. 藜麦种子总黄酮提取及其抗氧化性[J]. 江苏农业科学,2015,43(10): 355-358

(收稿日期: 2017-03-28)