

三叶草种质资源数据质量控制规范

1 范围

本规范规定了三叶草种质资源数据采集过程中的质量控制内容和方法。

本规范适用于三叶草种质资源的整理、整合和共享。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本规范,然而,鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本规范。

ISO 3166 Codes for the Representation of Names of Countries

GB/T 2659 世界各国和地区名称代码

GB/T 2260 中华人民共和国行政区划代码

GB/T 12404 单位隶属关系代码

GB/T 3543-1995 农作物种子检验规程

GB/T 2930-2001 牧草种子检验规程

GB/T 4407 经济作物种子

GB/7415 主要农作物种子贮藏

GB/T 6142-1985 豆科主要栽培牧草种子质量分级

GB/T 6432—1994 饲料中粗蛋白质测定方法

GB/T 6433—1994 饲料粗脂肪测定方法

GB/T 6434—1994 饲料中粗纤维测定方法

GB/T 6438—1992 饲料中粗灰分的测定方法

GB/T 6437—2002 饲料中总磷的测定 分光光度法

GB/T 6436—2002 饲料中钙的测定方法

GB/T 18246—2000 饲料中氨基酸的测定

GB/T 6435—1986 饲料水分的测定方法

GB/T 8170~1987 数值修约规则

3 数据质量控制的基本方法

3.1 形态特征和生物学特性观测试验设计

3.1.1 试验地点

试验地点的环境条件应能够满足三叶草的正常生长及其性状的正常表达。

3.1.2 田间设计

确定播期主要取决于气温、土壤墒情、三叶草生物学特性及其利用目的，以及田间杂草发生规律和为害程度等因素。春播在3月中旬前，秋播10月中旬前为宜。

试验小区为 $10\text{m}^2(2\text{m}\times 5\text{m})$ ，随机区组排列，3次重复。一般采取条播，行距 $30\sim 45\text{cm}$ ；种子量少的可穴播或育苗移栽，株距大于 20cm 。

3.1.3 栽培环境条件控制

试验地土质应具有当地代表性，肥力均匀，要远离污染、无人畜侵扰。采用一致的水肥管理条件，及时防治病虫害和防除杂草，保证幼苗和植株的正常生长。

3.1.4 保护行设置

试验地周围应设保护行或保护区。

3.2 数据采集

形态特征和生物学特性观测试验原始数据的采集应在种质正常生长情况下获得。如遇自然灾害等因素严重影响植株正常生长，应重新进行观测试验和数据采集。

3.3 试验数据统计分析和校验

每份种质的形态特征和生物学特性观测数据依据对照品种进行校验。根据2年度以上的观测校验值，计算每份种质性状的平均值、变异系数和标准差，并进行方差分析，判断试验结果的稳定性和可靠性。取校验值的平均值作为该种质的性状值。

4 基本信息

4.1 全国统一编号

全国统一编号由“CF”加6位顺序号组成的8位字符串，如“CF000888”。其中“CF”代表China Forage的第一个字母，后6位数字代表具体牧草种质的编号。全国统一编号具有惟一性。

4.2 种质库编号

种质库编号是由“I7B”加5位顺序号组成的8位字符串，如“I7B00216”。其中“I”代表国家农作物种质资源长期库中的牧草种质，“7B”代表牧草，后五位为顺序号，从“00001”到“99999”，代表具体牧草种质的编号。只有已进入国家农作物种质资源长期库保存的种质才有种质库编号。每份种质具有惟一的种质库编号。

4.3 种质圃编号

种质在国家多年生和无性繁殖圃的编号。牧草圃编号为8位字符串，如“GPMC0152”，前4位“GPMC”为国家给牧草圃的代码，后4位为顺序号，代表具体牧草种质的编号。每份种质具有惟一的圃编号。

4.4 引种号

引种号是由年份加4位顺序号组成的8位字符串，如“19990026”，前4位表示种质从境外引进年份，后4位为顺序号。每份引进种质具有惟一的引种号。

4.5 采集号

三叶草种质在野外采集时赋予的编号，一般由年份加2位省份代码加顺序号组成。

4.6 种质名称

三叶草国内种质的原始名称和国外引进种质的中文译名，如果有多个名称，可以放在英文括号内，用英文逗号分隔，如“种质名称1(种质名称2, 种质名称3)；国外引进种质如果没有中文译名，可以直接填写种质的外文名。

4.7 种质外文名

三叶草国外引进种质的外文名和国内种质的汉语拼音名。每个汉字的汉语拼音之间空一格，每个汉字汉语拼音的首字母大写，如“Bai San Ye”。国外引进种质的外文名应注意大小写和空格。

4.8 科名

三叶草种质资源在植物分类学上的科名。由拉丁名加英文括号内的中文名组成，如“Leguminosae(豆科)”。如没有中文名直接写拉丁名。

4.9 属名

三叶草种质资源在植物分类学上的属名。由拉丁名加英文括号内的中文名组成，如“*Trifolium* L. (三叶草属)”。如果没有中文名，直接填写拉丁名。

4.10 学名

三叶草种质在植物分类学上的种、亚种或变种的学名，由拉丁名加英文括号内的中文名组成，如“*Trifolium repen* L. (白三叶)”。如果没有中文名，直接填写拉丁名。有的植物在分类学上有两个以上的学名，应以《中国植物志》所用的名称为正名。《中国植物志》未包含的种，以国际植物学界最新出版的专著或专论中所用的名称为正名。其它则以异名列在正名之后。

4.11 原产国

三叶草种质原产国家名称、地区名称或国际组织名称。国家和地区名称参照 ISO 3166 和 GB/T 2659。如该国已不存在，应在原国家名称前加“原”，如“原苏联”。国际组织名称用该组织的外文缩写，如“IPGRI”。

4.12 原产省

三叶草种质原产省份名称，省份名称参照 GB/T 2260；国外引进种质资源原产省用原产国家一级行政区的名称。

4.13 原产地

三叶草种质的原产地县（县级市、区）、乡（镇）、村名称。县（县级市）名参照 GB/T 2260。

4.14 海拔

三叶草种质原产地具体生长地点的海拔高度。单位为 m。

4.15 经度

三叶草种质原产地的经度，单位为度和分，格式为 DDDFF，其中 DDD 为度，FF 为分。东经为正值，西经为负值，例如，“12125”代表东经 121°25′，“-10209”代表西经 102°9′。

4.16 纬度

三叶草种质原产地的纬度，单位为度和分，格式为 DDFF，其中 DD 为度，FF 为分。北纬为正值，南纬为负值，例如，“3208”代表北纬 32°8′，“-2542”代表南纬 25°42′。

4.17 来源地

国内三叶草种质的来源省、县名称，名称参照 GB/T 2260；国外引进种质的来源国家、地区名称或国际组织名称，名称参照 ISO 3166 和 GB/T 2659。

4.18 保存单位

三叶草种质提交国家种质资源长期库前的原保存单位名称。单位名称应写全称，例如“中国农业科学院草原研究所”。

4.19 保存单位编号

三叶草种质原保存单位赋予的种质编号。保存单位编号在同一保存单位应具有唯一性。

4.20 系谱

三叶草选育品种(系)的亲缘关系。

4.21 选育单位

选育三叶草品种(系)的单位全称或个人姓名。

4.22 育成年份

三叶草品种选育成功，经审定通过或鉴定的年份。

4.23 选育方法

三叶草品种(系)的育种方法。

4.24 种质类型

三叶草种质类型分 6 类。

- 1 野生资源
- 2 地方品种
- 3 选育品种
- 4 品系
- 5 遗传材料
- 6 其他

4.25 种质保存类型

三叶草种质的保存类型，分 6 类。

- 1 种子
- 2 植株

- 3 种茎
- 4 花粉
- 5 培养物
- 6 DNA

4.26 图像

三叶草种质的图像文件名，图像格式为.jpg。图像文件名由统一编号加“-”加序号加“.jpg”组成。如有多个图像文件，图像文件名用英文分号分隔，如“CF000010-1.jpg; CF000010-2.jpg”。图像对象主要包括植株、花、果实、特异性状等。图像要清晰，对象要突出。

4.27 观测地点

三叶草种质形态特征和生物学特性观测地点的名称，记录到省和县名，如“内蒙古多伦”。

4.28 观测年龄

三叶草种质形态特征和生物学特性的观测年龄。单位为 a。

5 形态特征和生物学特性

5.1 主根有无

三叶草花期，以试验小区的植株为调查对象，采用目测的方法测定主根的有无。

- | | |
|---|---|
| 0 | 无 |
| 1 | 有 |

5.2 主根粗

三叶草花期，从每一试验小区内随机抽样 10 株，测量每一植株主根的横径，计算平均值。单位为 mm，精确到 0.1mm。

5.3 根系入土深度

三叶草花期，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，采用土层剖面法，测量由土表到根系末端的深度。单位为 cm，精确到 0.1 cm。

5.4 根瘤数量

三叶草花期，从 3 个试验小区分别随机抽取 5 个植株的根系，根据描述规

范所附的模式图及下列说明，目测、评定其根瘤的密度或数量，分为3级。

- 1 少(根系上可目测到的根瘤极少，20%以下的根系根毛上着生有根瘤)
- 2 中(根系上可目测到的根瘤较密，约20%~50%的根系根毛上着生有根瘤)
- 3 多(根系上可目测到的根瘤极密，50%以上的根系根毛上着生有根瘤)

5.5 茎的类型

三叶草花期，从试验小区随机抽取10株，采用目测法，参照描述规范所附的模式图及下列说明确定茎的类型。以相同茎类型的植株达到70%为准。

- 1 直立茎(茎垂直于地面)
- 2 斜生茎(茎基部或下部偏斜，其上半部为直立)
- 3 平卧茎(茎平卧于地上，但茎上不产生不定根)
- 4 半匍匐茎(茎半平卧于地上，着地的茎节上产生不定根)
- 5 匍匐茎(茎平卧于地上，但所有茎节上均产生不定根)

5.6 茎的形状

三叶草花期，从试验小区随机抽取10株，采用目测法，参照描述规范所附的模式图及下列说明确定茎的形状。以相同茎形状的植株达到70%为准。

- 1 圆柱状(茎杆呈圆柱状，其上无棱角)
- 2 四棱状(茎杆呈四棱状，其上有四个棱角)
- 3 多棱状(茎杆呈多棱状，其上有规则的多个棱角)

5.7 匍匐茎

三叶草花期，从试验小区随机抽取10株，采用目测法，参照描述规范所附的模式图及下列说明确定匍匐茎的有无。

- 0 无
- 1 有

5.8 茎上生根

三叶草花期，从试验小区随机抽取10株，采用目测法，参照描述规范所附的模式图及下列说明确定茎上是否长有不定根。

- 0 无

1 有

5.9 茎长度

在植株开花期，以整个试验小区的植株为观测对象，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，测量植株主茎长度。单位为 cm，精确到一位小数。

5.10 茎节数

在植株开花期，以整个试验小区的植株为观测对象，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，采用目测法观测植株主茎第一个节到主茎末梢的节数。单位为节，精确到整位数。

5.11 茎直径

在植株开花期，以整个试验小区的植株为观测对象，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，测量植株主茎第四个节间的直径。单位为 mm，精确到一位小数。

5.12 茎分枝

在植株开花期，以整个试验小区的植株为观测对象，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，采用目测法观测每个植株主茎分枝的数目。单位为枝/株，精确到整位数。

5.13 茎被毛

在植株开花期，以整个试验小区的植株为观测对象，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，采用目测法，并参照描述规范所附的模式图及下列说明确定植株茎表面毛的状况。以相同茎毛状况植株达到 70% 为准。

- 0 无（茎光滑无毛）
- 1 少（茎上被毛极为稀疏）
- 2 中（茎上被毛明显，但不很稠密）
- 3 密（茎上被毛极为稠密）

5.14 掌状复叶小叶数

在植株开花期，以整个试验小区的植株为观测对象，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，采用目测法观测每个复叶包含小叶的数目。分下列 3 种类型。

- 1 3 个
- 2 5 个
- 3 7 个

5.15 托叶抱茎

三叶草花期，以试验小区的植株为观测对象，采用目测法观察三叶草种质托叶在茎上的着生方式，参照描述规范所附的模式图及下列说明确定托叶是否抱茎。分为 2 类。

- 0 不抱茎（托叶除着生出与茎结合，其余部分与茎分离）
- 1 抱茎（托叶除着生出与茎结合外，其余的一部分包裹着茎）

5.16 托叶形状

三叶草花期，以试验小区的植株为观测对象，采用目测法观察三叶草种质茎中部托叶的形状，参照描述规范所附的模式图及下列说明确定托叶形状。以相同托叶形状的植株达到 70% 为准。

- 1 狭披针形（托叶的长约为宽的 5-6 倍，中部或中部以下最宽，向上渐狭）
- 2 披针形（托叶的长约为宽的 4-5 倍，中部或中部以下最宽，向上渐狭）
- 3 卵状披针形（下部卵形，上部披针形）
- 4 心形（长宽比例如卵形，但基部宽圆）
- 5 近卵形（托叶形状近似于鸡卵，中部以下最宽）
- 6 椭圆形（托叶的长约为宽的 3-4 倍，两侧边缘呈弧形）
- 7 近三角形（基部宽，近呈平截形，三边近相等）

5.17 托叶被毛

三叶草花期，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，采用目测法，并参照描述规范所附的模式图及下列的说明确定托叶被毛有无及毛的密度。以相同茎毛状况植株达到 70% 为准。

- 0 无（托叶光滑无毛）
- 1 疏（托叶被毛为稀疏）
- 2 密（托叶被毛极为稠密）

5.18 托叶质地

三叶草花期，以试验小区的植株为观测对象，采用目测法观察三叶草种质托叶的质地。分为3类。

- 1 膜质（托叶质地薄而半透明状）
- 2 半膜质（托叶质地为薄膜质、非透明）
- 3 草质（托叶质地薄而柔软、草质状、绿色）

5.19 小叶形状

三叶草花期，在试验小区内随机抽取开花的植株10株，采用直尺测量及目测法，并参照描述规范所附的模式图及下列的说明确定茎中部的叶片形状。以相同叶形状的植株达到70%为准。

- 1 圆形（形如圆盘）
- 2 卵形（形如鸡卵，中部以下较宽）
- 3 倒卵形（形如鸡卵，中部以上较宽）
- 4 椭圆形（长约为宽的3到4倍，但两侧边缘呈弧形，顶、基两端略相等）
- 5 菱形（等边斜方形）
- 6 披针形（长约为宽的4到5倍，中部或中部以下最宽，向上下两端渐狭）
- 7 狭披针形（比披针形更狭窄）

5.20 小叶叶尖

三叶草花期，在试验小区内随机抽取开花的植株10株，采用目测法，并参照描述规范所附的模式图及下列的说明确定茎中部的叶片尖端形状。以相同叶尖形状的植株达到70%为准。

- 1 锐尖（尖端成一锐角形而有直边）
- 2 钝形（先端钝或狭圆形）
- 3 微凹（先端稍凹入）

5.21 小叶叶缘

三叶草花期，在试验小区内随机抽取开花的植株10株，采用目测法观测，并参照描述规范所附的模式图及下列的说明确定茎中部的叶片边缘形状。以相同叶缘形状的植株达到70%为准。

- 1 全缘（边缘平滑）

2 细锯齿（具有较小的锯齿）

3 钝齿（边缘具有钝头的齿）

5.22 小叶被毛

三叶草花期，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，采用目测法观测，并参照描述规范所附的模式图及下列的说明确定小叶被毛有无及毛的密度。以相同叶片被毛的植株达到 70% 为准。

1 无（小叶光滑无毛）

2 疏（小叶被毛较为稀疏）

3 密（小叶被毛极为稠密）

5.23 顶生小叶长度

三叶草花期，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，分别测量每一株中部顶生小叶从叶颈至叶尖的绝对长度。单位为 cm，精确到一位小数。

5.24 顶生小叶宽度

三叶草花期，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，分别测量每一株中部顶生小叶最宽处的绝对长度。内卷或反卷的叶片要展开测量。单位为 cm，精确到一位小数。

5.25 侧生小叶长度

三叶草花期，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，分别测量每一株中部侧生小叶从叶颈至叶尖的绝对长度。单位为 cm，精确到一位小数。

5.26 侧生小叶宽度

三叶草花期，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，分别测量每一株中部侧生小叶最宽处的绝对长度。内卷或反卷的叶片要展开测量。单位为 cm，精确到一位小数。

5.27 小叶长宽比

三叶草花期，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，分别测量每一株中部小叶长度和宽度的比例，精确到一位小数。

5.28 叶斑颜色

三叶草花期，以整个试验小区的植株为观测对象，在正常一致的光照条件下，采用目测法观测叶片“V”型斑纹的颜色。以相同叶斑颜色的植株达到 70% 为准。

- 1 白色
- 2 淡灰色
- 3 黄色
- 4 淡绿色
- 5 红色

5.29 叶斑强度

三叶草花期，以整个试验小区的植株为观测对象，在正常一致的光照条件下，采用目测法，并参照描述规范所附的模式图确定植株中部小叶叶片表面斑纹的强度。以相同叶斑强度的植株达到 70%为准。

- 0 无
- 1 弱
- 2 中
- 3 强
- 4 非常强

5.30 叶斑形状

三叶草花期，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，采用目测法，并参照描述规范所附的模式图确定茎中部的叶片表面斑纹的形状。以相同叶斑形状的植株达到 70%为准。

- 1 V 型
- 2 非 V 型

5.31 叶柄长

三叶草花期，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，分别测量每一株中部叶柄的长度。单位为 cm，精确到一位小数。

5.32 花序类型

在植株盛花期，以试验小区的植株为观测对象，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，采用目测法观测，并参照描述规范所附的模式图及下列的说明确定花序的类型。分为 5 类。

- 1 头状（花无柄或近无柄，多数密集于一短而宽、平坦或隆起的总托上形成一头状体）
- 2 短总状（花多数具柄，排列于不分枝的主轴上，但花序极短）

- 3 穗形总状（花多数，花柄短或近无柄，排列于不分枝的主轴上，呈穗形的总状花序）
- 4 穗状（花多数无柄，排列于不分枝的主轴上）
- 5 单生（一朵花单独着生于枝顶或叶腋的花序类型）

5.33 花序形状

在植株盛花期，以试验小区的植株为观测对象，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，采用目测法观测，并参照描述规范所附的模式图确定花序的形状。以相同花序形状的植株达到 70% 为准，分为 5 类。

- 1 球形
- 2 卵形
- 3 狭卵形
- 4 阔圆柱形
- 5 狭圆柱形

5.34 花序长度

在植株盛花期，以试验小区的植株为观测对象，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，测量花序的长度。单位为 cm，精确到一位小数。

5.35 花序宽度

在植株盛花期，以试验小区的植株为观测对象，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，测量花序的宽度。单位为 cm，精确到一位小数。

5.36 花序着生方式

在植株盛花期，以试验小区的植株为观测对象，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，采用目测法，并参照描述规范所附的模式图及下列的说明确定花序着生的基本方式。

- 1 腋生（花序生于叶腋内）
- 2 顶生（花序生于枝的顶端）

5.37 每株花序数

在植株盛花期，以试验小区的植株为观测对象，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，采用目测法观测计数每株上的花序数。单位为个，精确到整数。

5.38 每花序小花数

在植株盛花期，以试验小区的植株为观测对象，随机选取主茎从上往下数第二个花节上的花序 10 个，计数花序上的花数。单位为个，精确到整位数。

5.39 花柄有无

在植株盛花期，以试验小区的植株为观测对象，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，采用目测法观测花柄的有无。以相同花柄状况的植株达到 70% 为准。

- 0 无
- 1 近无柄（花柄极短， $<1.5\text{mm}$ ）
- 2 明显有柄（花柄明显，其长 $>1.5\text{mm}$ ）

5.40 萼筒形状

在植株盛花期，以试验小区的植株为观测对象，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，采用目测法，并参照描述规范所附的模式图及下列的说明确定萼筒的基本形状。以相同萼筒形状的植株达到 70% 为准。

- 1 筒形（萼筒大部分成一管状或圆筒状）
- 2 钟形（萼筒宽而稍短，上部扩大成一钟形）

5.41 萼筒被毛

在植株盛花期，以试验小区的植株为观测对象，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，采用目测法，并参照描述规范所附的模式图及下列说明确定萼筒表面被毛的状况。以相同萼筒被毛的植株达到 70% 为准。

- 0 无（萼筒光滑无毛）
- 1 疏（萼筒被毛较为稀疏）
- 2 密（萼筒被毛极为稠密）

5.42 萼齿被毛

在植株盛花期，以试验小区的植株为观测对象，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，采用目测法，并参照描述规范所附的模式图及下列说明确定萼齿表面被毛的状况。以相同萼筒被毛的植株达到 70% 为准。

- 0 无（萼齿光滑无毛）
- 1 疏（萼齿被毛较为稀疏）
- 2 密（萼齿被毛极为稠密）

5.43 萼筒脉纹

在植株盛花期，以试验小区的植株为观测对象，在试验小区内随机抽取开花的植株 10 株，观测花萼萼筒脉纹的数目。单位为条，精确到整数位。

5.44 花冠颜色

在植株盛花期，以试验小区的植株为观测对象，在正常一致的光照条件下，采用目测法观测花冠的基本颜色，并用标准色卡加以比较。以相同花冠颜色的植株达到 70% 为准。

- 1 白色
- 2 乳白色
- 3 黄粉色
- 4 浅粉色
- 5 粉红色
- 6 浅红色
- 7 深红色
- 8 紫红色
- 9 浅紫色

5.45 荚果长

在植株终花期与成熟期之间，以试验小区的植株为观测对象，随机抽取植株中下部充分生长发育的荚果 10 个，测量荚尖到荚尾的距离。单位为 cm，精确到一位小数。

5.46 荚果形状

在植株终花期与成熟期之间，以试验小区的植株为观测对象，在试验小区内随机抽取结实的植株 10 株，采用目测法，并参照描述规范所附的模式图及下列说明确定荚果的形状。以相同荚果形状的植株达到 70% 为准。

- 1 球形（轮廓圆形）
- 2 矩圆形（长约为宽的 3-4 倍，两侧边缘略平行）
- 3 条状矩圆形（长约为宽的 4-5 倍，两侧边缘略平行）
- 4 卵状矩圆形（上部形同矩圆形，但下部较宽形如卵状）
- 5 倒卵状矩圆形（下部形同矩圆形，但上部较宽形如倒卵状）
- 6 倒卵形（形如倒置的鸡卵，中部以上较宽）

5.47 单荚粒数

在植株成熟期，以试验小区的植株为观测对象，随机抽取 10 个干熟荚果，计数每个荚果所含的种子粒数。单位为粒，精确到整位数。

5.48 荚果裂荚性

三叶草成熟期，以试验小区的植株为观测对象，随机抽取 10 个荚果，观察荚果开裂与否的情况分为 3 类。

- 1 不（荚果成熟后不开裂）
- 2 稍易（荚果成熟后，少数荚果自然开裂）
- 3 易（荚果成熟后，多数或全部荚果自然开裂）

5.49 种子长度

采集风干后的成熟干籽粒为观测对象，随机抽取 10 粒干种子，测量最长处的长度。单位为 mm，精确到一位小数。

5.50 种子宽度

采集风干后的成熟干籽粒为观测对象，随机抽取 10 粒干种子，测量最宽处的长度。单位为 mm，精确到一位小数。

5.51 种子形状

采集风干后的成熟干籽粒为观测对象，采用目测法，并参照描述规范所附的模式图及下列的说明确定种子形状。以相同种子形状的植株达到 70% 为准。

- 1 肾形（横径较长，形如肾状）
- 2 卵圆形（形如宽椭圆形，但长为宽的 2 倍以下）
- 3 椭圆形（长约为宽的 3 到 4 倍，但两侧边缘呈弧形，顶、基两端略相等）
- 4 心形（长宽比例如卵形，但基部宽圆而凹缺）
- 5 圆形（形状似圆球状）

5.52 种子颜色

采集风干后的成熟干籽粒为观测对象，在正常一致的光照条件下，采用目测的方法观测种子的外观颜色，并用标准色卡加以比较。以相同种子的颜色达到 70% 为准。

- 1 乳白色
- 2 黄色
- 3 橄榄绿

- 4 褐色
- 5 墨绿色
- 6 紫色
- 7 黑色

5.53 形态一致性

三叶草花期，用目测法观测群体内主要形态性状。根据主要形态性状的表现，将其形态一致性分为3类。

- 1 一致（大多数形态性状基本一致）
- 2 较一致（主要形态性状上存在差异，但差异较小，不容易清楚地区分）
- 3 不一致（主要形态性状差异较大，而且能明显区分开来）

5.54 播种期

不同地区牧草适宜播种的日期。以“年月日”表示，格式“YYYYMMDD”。如“20040612”表示2004年6月12日播种。

5.55 出苗期

种子萌发出土的日期。以全小区为调查对象，记录小区内50%的幼苗露出地面的日期。以“年月日”表示，格式“YYYYMMDD”。

5.56 返青期

记录小区内50%的植株返青的日期。以“年月日”表示，格式“YYYYMMDD”。

5.57 分枝期

50%的幼苗从其基部叶腋产生侧芽，并形成新枝的日期。以“年月日”表示，格式“YYYYMMDD”。

5.58 现蕾期

50%植株形成花苞之时为现蕾期。以“年月日”表示，格式“YYYYMMDD”。

5.59 始花期

20%的植株花冠张开，雄蕊伸出，开始散发花粉开花之时为始花期。以“年月日”表示，格式“YYYYMMDD”。

5.60 盛花期

80%的植株花冠张开，雄蕊伸出，开始散发花粉开花之时为盛花期。以“年月日”表示，格式“YYYYMMDD”。

5.61 开花期一致性

三叶草开花期，用目测法观测群体内开花期是否一致，开花期一致性分为3类。

- 1 一致（大多数开花期基本一致）
- 2 较一致（开花期存在差异，但差异较小，不容易清楚地区分）
- 3 不一致（开花期差异较大，而且能明显区分开来）

5.62 结荚初期

20%的植株出现绿色荚果时为结荚初期。以“年月日”表示，格式“YYYYMMDD”。

5.63 结荚盛期

80%的植株出现绿色荚果时为结荚盛期。以“年月日”表示，格式“YYYYMMDD”。

5.64 成熟期

80%的种子成熟的日期为成熟期。以“年月日”表示，格式“YYYYMMDD”。

5.65 成熟期一致性

三叶草成熟期之内，用目测法观测群体内成熟期是否一致，成熟期一致性分为3类。

- 1 一致（大多数成熟期基本一致）
- 2 较一致（成熟期存在差异，但差异较小，不容易清楚地区分）
- 3 不一致（成熟期差异较大，而且能明显区分开来）

5.66 生育天数

由出苗至种子成熟的总天数。单位为d。

5.67 枯黄期

茎叶干枯，种子大多数脱落的日期。北方地区的枯黄期一般在秋霜或冬寒后出现，南方地区的枯黄期出现在高温干旱或低温条件下。以全小区为调查对象，记录观测小区内50%的植株达到枯黄的日期。以“年月日”表示，格式“YYYYMMDD”。

5.68 生长天数

由出苗或返青期到枯黄期的总天数。单位为d。

5.69 鲜草产量

一个生长周期中单位面积三叶草鲜草的累计产量。根据试验小区所在的气候带自行确定不同的刈割次数。测产时在行播试验小区内随机设4个样方，样方面积为 $0.25\text{m}^2(0.5\text{m}\times 0.5\text{m})$ 。设样方时注意避开小区边缘地段。留茬高度为4~6cm。鲜草产量必须在田间测定，为防止水分散失，应及时称重。最初测定时的单位为 g/m^2 ，精确到整位数，然后换算为 kg/hm^2 ，精确到整位数。

5.70 干草产量

三叶草的干草产量是在鲜草测产样品自然风干后称重。单位为 kg/hm^2 ，精确到整位数。

5.71 茎叶比

植株开花期测定。在试验小区内随机抽取开花或未开花的植株10株（丛），分别齐地面剪下，迅速分出茎和叶，分别称鲜重，单位为g，精确到0.1g。然后用下列公式计算单株的茎叶比。以%表示，精确到0.01%。

$$X=L_g/S_g\times 100$$

式中：X——叶重与茎重的比值

S_g ——茎重，g

L_g ——叶重，g

5.72 植株高度

植株开花期测定。在试验小区内随机抽取开花的植株10株，测量自地面到植株最上部叶片自然状态下的最高部位。单位为cm，精确到0.1cm。

5.73 生殖枝高度

植株开花期测定。在试验小区内随机抽取开花的植株10株，分别测量自地面到植株花序自然状态下的最高部位。单位为cm，精确到0.1cm。

5.74 草层高度

在试验小区内随机抽取开花的植株10株，测量从地面到草层最高点的自然高度。单位为cm，精确到0.1cm。

5.75 种子产量

种子产量测定在种子完熟期进行。测产时在行播试验小区随机设4个样方，样方面积为 $1\text{m}^2(1\text{m}\times 1\text{m})$ 。设样方时注意避开小区边缘和测过鲜草产量的地段。最初测定时的单位为 g/m^2 ，精确到整位数，然后换算为 kg/hm^2 ，精确到整位数。

5.76 种子含水量

按照常规程序把种子样品烘干所失去的重量占原始样品重量的百分率。参照 GB/T 2930.8-2001。以%表示，精确到 0.01%。种子含水量的计算公式如下：

$$W(\%) = \frac{w_1 - w_2}{w_1} \times 100$$

式中：W——种子含水量

w_1 ——原始样品重量，g

w_2 ——烘干后样品重量，g

5.77 千粒重

待测样品应为新鲜风干，并经过清选的种子。样品数量控制在小粒种子 150g、中粒种子 500g。参照 GB/T2930--2001 牧草种子检验规程，随机取样，4 次重复，每个重复 1000 粒种子，用 1/1000 的电子天平称取每 1000 粒种子的重量。单位为 g，精确到 0.01g。

5.78 发芽势

发芽势的数据采集是在进行种子发芽率检测初期进行，参照 GB/T 2930.2 标准所规定的天数，记录正常发芽的种子数占供试种子的百分比。以%表示，精确到 0.1%。发芽势的计算公式如下：

$$\text{发芽势}(\%) = \frac{\text{规定天数内全部正常发芽种子数}}{\text{供试种子数}} \times 100$$

5.79 发芽率

在实验室控制及标准条件下对种子发芽率进行检测，至发芽终期全部正常发芽的种子数占供试种子的百分比即为发芽率。参照 GB/T2930.4-2001 牧草种子检验规程进行发芽率测定。以%表示，精确到 0.01%。种子发芽率的计算公式为：

$$\text{发芽率}(\%) = \frac{\text{发芽终期全部正常发芽种子数}}{\text{供试种子数}} \times 100$$

5.80 种子硬实率

实验期间不能吸水而始终保持坚硬的种子数占供试种子的百分比。参照 GB/T2930.4-2001 牧草种子检验规程进行发芽率测定。以%表示，精确到

0.01%。种子硬实率计算公式为：

$$\text{种子硬实率}(\%) = \frac{\text{有生命力而不发芽的种子数}}{\text{供试种子数}} \times 100$$

5.81 种子生活力

种子发芽潜在能力或种胚具有的生命力。参照 GB/T2930.5-2001 牧草种子检验规程进行发芽率测定。以%表示，精确到 0.01%。

测定方法

试剂及染色液配制：使用 2, 3, 5-三苯基氯化四唑或溴化四唑的 1.0%水溶液。水的 pH 值在 6.5~7.5 之间。

如果用蒸馏水配制的溶液 PH 值不能保持在 6.5~7.5 范围内，则采用磷酸缓冲溶液配制。缓冲溶液配制如下：

溶液 I：在 1 000 ml 水中溶解 9.078 g 磷酸二氧钾(KH_2PO_4)；

溶液 II：在 1 000 ml 水中溶解 9.472 g 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)，或在 1 000 ml 水中溶解 11.876g 含两个结晶水的磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。

取母液 I 2 份和母液 II 3 份混合而得缓冲溶液。

称 1g 三苯基氯化四唑或溴化四唑，溶解在 100 ml 缓冲液中。配制成的溶液保存在黑暗处或棕色瓶里。染色反应在黑暗条件下进行。

试验样品：从净种子中数取 400 粒种子，分成 4 个重复，每一重复 100 粒。

种子预湿：三叶草种子在染色前进行预先湿润。预湿后吸胀的种子不易破碎，容易切开。另外，染成的颜色更为均匀，利于鉴定。为避免释壳妨碍吸胀，须除去释壳。预湿可采用下列方法之一。

缓慢润湿：在 20℃恒温条件下，将种子置于纸间(BP)吸湿 16 小时。此法用于那些直接浸在水中容易破裂的种子、陈种子或干燥种子。

水中浸渍法(W)：在 20℃恒温条件下，将种子全部浸泡在水里，让其达到充分吸胀。三叶草种子浸泡 3 小时即可。具体预湿时间和方法参照 GB/T 2930.5—2001 中的表 1。

染色前的准备：

①去颖，在胚附近横切

②纵切胚及 3/4 胚乳

染色：按 GB/T 2930.5—2001 中的表 1 规定的染色浓度(1%)、温度(30℃)

和时间 (BP, 18h; W, 2h) 将准备好的种子或胚完全浸入四唑溶液, 移置黑暗处或弱光下染色。染色结束后, 倒去四唑溶液, 用清水冲洗后即可观察鉴定。

鉴定: 在立体解剖镜下进行观察鉴定, 根据种胚主要结构的染色情况辨别有生活力和无生活力的种子。通常, 胚的全部或主要结构染成鲜红色的, 为有生活力的种子。染色不正常或染成浅色斑点者为无生活力的种子。三叶草凡胚根不染色, 柔软或坏死的面积在 1/3 以上者, 为无生活力的种子。

结果计算:

$$SV(\%) = \frac{N_1}{N} \times 100$$

式中: SV——种子生活力, %

N ——供试种子数

N_1 ——全部正常染色的种子数

允许差: 参照 GB/T 2930.4—2001 中的表 B1, 如果 4 次重复的数值之间均未超出最大容许差距, 则结果是可靠的, 4 次重复的平均数即为该样品的生活力。如果 4 次重复的数值之间超出最大容许差距, 则应进行再次试验。如果两次试验结果未超出最大容许差距, 则两次结果的平均数为该样品的生活力。如果两次结果超出最大容许差距, 则应用同样的方法进行第三次试验, 记录相符合的两次结果的平均数。

5.82 种子寿命

在一定环境条件下三叶草种子生活力保持的期限。单位为 a。

5.83 熟性

以生育天数的多少来确定。

- 1 早熟 (生育天数 < 80d)
- 2 中熟 (生育天数为 80d~110d)
- 3 晚熟 (生育天数 > 110d)

5.84 越冬率

在枯黄期之前, 在试验小区中央地段内随机抽出 3 个一定面积或样段的样方, 记录越冬前 3 个样方内的株丛数; 返青后再记录 3 个标记样方内的返青株丛数, 返青的株丛数与越冬前的株丛数之比即为越冬率。以%表示, 精确到 0.1%。

越冬率的计算公式为：

$$\text{越冬率}(\%) = \frac{\text{返青的株丛数}}{\text{越冬前的株丛数}} \times 100$$

5.85 再生性

三叶草刈割或放牧利用后具有重新恢复绿色株丛的能力，以再生速度、再生次数和再生草产量来衡量。

- 1 良好（再生速度快，再生次数多，再生草产量高）
- 2 中等（在 1 与 3 之间）
- 3 较差（再生速度慢，再生次数少，再生草产量低）

5.86 生长周期

三叶草种质生活周期的基本类型。

- 1 一年生
- 2 二年生
- 3 多年生

5.87 生长习性

以整个试验小区的三叶草植株为观测对象，通过一年的观测或多年的连续观测，依据其生活周期、生活型及茎的类型加以综合判定。

- 1 一年生直立（斜升、平卧）草本
- 2 二年生直立（斜升、平卧）草本
- 3 多年生直立（斜升、平卧）草本
- 4 一年生匍匐（半匍匐）草本
- 5 二年生匍匐（半匍匐）草本
- 6 多年生匍匐（半匍匐）草本

5.88 生长寿命

从多年生三叶草种质材料播种当年算起，记录田间株丛存活率高于 30% 的总年限。单位为 a。

6 品质特性

6.1 水分含量

三叶草样品中水分占干物质的百分比。开花期采样，按照 GB/T 6435-1986 饲料水分的测定方法进行。以%表示，精确到 0.01%。

仪器设备

- ①实验室用样品粉碎机或研钵；
- ②分样筛：孔径 0.45 mm(40 目)；
- ③分析天平：感量为 0.0001g；
- ④电热式恒温烘箱：可控制温度为 $105 \pm 2^\circ\text{C}$ ；
- ⑤称样皿：玻璃或铝质，直径 40mm 以上，高 25mm 以下；
- ⑥干燥器：用氯化钙(干燥试剂)或变色硅胶作干燥剂。

样品的选取和制备

- ①选取有代表性的样品，其原始样量应在 1000g 以上；
- ②用四分法将原始样品缩至 500g，风干后粉碎至 40 目，再用四分法缩至 200g，装入密封容器，放阴凉干燥处保存。

测定步骤

- ①洁净称样皿，在 $105 \pm 2^\circ\text{C}$ 烘箱中烘 1h，取出，在干燥器中冷却 30min，称准至 0.0002g，再烘干 30min，同样冷却，称重，直至两次重量之差小于 0.0005g 为恒重；
- ②用已恒重称样皿称取两份平行样品，每份 2~5g(含水重 0.1g 以上，样品厚度 4mm 以下)。准确至 0.0002g，不盖称样皿盖，在 $105 \pm 2^\circ\text{C}$ 烘箱中烘 3h(以温度到达 105°C 开始计时)，取出，盖好称样皿盖，在干燥器中冷却 30min，称重；
- ③再同样烘干 1h，冷却，称重，直至两次称重之重量差小于 0.002g。

结果计算

$$W(\%) = \frac{w_1 - w_2}{w_1 - w_0} \times 100$$

式中：W——水分含量，%

w_1 —— 105°C 烘干前样品及称样皿重，g

w_2 —— 105°C 烘干后样品及称样皿重，g

w_0 ——已恒重的称样皿重，g

允许差：每个样品应取两个平行样进行测定，以其算术平均值为结果。两个平行样测定值相差不得超过 0.2%，否则重做。

6.2 粗蛋白含量

三叶草样品中粗蛋白质占干物质的百分比。开花期采样，按照 GB/T 6432-1994 饲料中粗蛋白测定方法进行。以%表示，精确到 0.01%。

试剂

- ①硫酸 (GB 625): 化学纯, 含量为 98%, 无氮;
- ②混合催化剂: 0.4 g 硫酸铜, 5 个结晶水 (GB 665), 6 g 硫酸钾 (HG3—920) 或硫酸钠 (HG3—908), 均为化学纯, 磨碎混匀;
- ③氢氧化钠 (GB 629): 化学纯, 40%水溶液 (M/V);
- ④硼酸 (GB 628): 化学纯, 2%水溶液 (M/V);
- ⑤混合指示剂: 甲基红 (HG3—958) 0.1%乙醇溶液, 溴甲酚绿 (HG 3—1220) 0.5%乙醇溶液, 两溶液等体积混合, 在阴凉处保存期为三个月;
- ⑥盐酸标准溶液: 邻苯二甲酸氢钾法标定, 按 GB 601 制备:
0.1 mol/l 盐酸 (HCl) 标准溶液: 8.3ml 盐酸 (GB 622), 分析纯, 注入 1 000ml 蒸馏水中);
0.02 mol/l 盐酸 (HCl) 标准溶液: 1.67ml 盐酸 (GB 622), 分析纯, 注入 1 000ml 蒸馏水中;
- ⑦蔗糖 (HG 3—1001): 分析纯;
- ⑧硫酸铵 (GB 1396): 分析纯, 干燥;
- ⑨硼酸吸收液: 1%硼酸水溶液 1 000ml, 加入 0.1%溴甲酚绿乙醇溶液 10 ml, 0.1%甲基红乙醇溶液 7 ml, 4%氢氧化钠水溶液 0.5 ml, 混合, 置阴凉处保存期为一个月 (全自动程序用)。

仪器设备

- ①实验室用样品粉碎机或研钵;
- ②分样筛: 孔径 0.45 mm (40 目);
- ③分析天平: 感量 0.0001g;
- ④消煮炉或电炉;
- ⑤滴定管: 酸式, 10、25 ml;
- ⑥凯氏烧瓶: 250 ml;
- ⑦凯氏蒸馏装置: 常量直接蒸馏式或半微量水蒸气蒸馏式;
- ⑧锥形瓶: 150、250 ml; 容量瓶: 100 ml;

⑨消煮管：250 ml；

⑩定氮仪：以凯氏原理制造的各种类型半自动，全自动蛋白质测定仪。

样品的选取和制备

选取具有代表性的样品用四分法缩减至 200 g，粉碎后全部通过 40 目筛，装于密封容器中，防止样品成分的变化。

分析步骤

①仲裁法

样品的消煮：称取样品 0.5~1 g(含氮量 5~80 mg)准确至 0.0002 g，放入凯氏烧瓶中，加入 6.4 g 混合催化剂，与样品混合均匀，再加入 12 ml 硫酸和 2 粒玻璃珠，将凯氏烧瓶置于电炉上加热，开始小火，待样品焦化，泡沫消失后，再加强火力(360~410℃)直至呈透明的蓝绿色，然后再继续加热，至少 2 h。

氨的蒸馏(蒸馏步骤的检验见 GB/T 6432-94 附录 A)：

常量蒸馏法：将样品消煮液冷却，加入 60~100 ml 蒸馏水，摇匀，冷却。将蒸馏装置的冷凝管末端浸入装有 25 ml 硼酸吸收液和 2 滴混合指示剂的锥形瓶内。然后小心地向凯氏烧瓶中加入 50 ml 氢氧化钠溶液，轻轻摇动凯氏烧瓶，使溶液混匀后再加热蒸馏，直至流出液体积为 100 ml。降下锥形瓶，使冷凝管末端离开液面，继续蒸馏 1~2 min，并用蒸馏水冲洗冷凝管末端，洗液均需流入锥形瓶内，然后停止蒸馏。

半微量蒸馏法：将样品消煮液冷却，加入 20 ml 蒸馏水，转入 100 ml 容量瓶中，冷却后用水稀释至刻度，摇匀，做为样品分解液。将半微量蒸馏装置的冷凝管末端浸入装有 20 ml 硼酸吸收液和 2 滴混合指示剂的锥形瓶内。蒸汽发生器的水中应加入甲基红指示剂数滴，硫酸数滴，在蒸馏过程中保持此液为橙红色，否则需补加硫酸。准确移取样品分解液 10~20 ml 注入蒸馏装置的反应室中，用少量蒸馏水冲洗进样入口，塞好入口玻璃塞，再加 10 ml 氢氧化钠溶液，小心提起玻璃塞使之流入反应室，将玻璃塞塞好，且在入口处加水密封，防止漏气。蒸馏 4 min 降下锥形瓶使冷凝管末端离开吸收液面，再蒸馏 1 min，用蒸馏水冲洗冷凝管末端，洗液均流入锥形瓶内，然后停止蒸馏。

上述两种蒸馏法测定结果相近，可任选一种。

蒸馏步骤的检验：精确称取 0.2 g 硫酸铵，代替样品，按常量蒸馏法或半微量蒸馏法步骤进行操作，测得硫酸铵含氮量为 $21.19 \pm 0.2\%$ ，否则应检查加碱、

蒸馏和滴定各步骤是否正确。

滴定：用常量蒸馏法或半微量蒸馏法蒸馏后的吸收液立即用 0.1 mol/l 或 0.02 mol/l 盐酸标准溶液滴定，溶液由蓝绿色变成灰红色为终点。

②推荐法

样品的消煮：称取 0.5~1g 样品(含氮量 5~80 mg)准确至 0.0002 g，放入消化管中，加 2 片消化片(仪器自备)或 6.4g 混合催化剂，12 ml 硫酸，于 420℃ 下在消煮炉上消化 1h。取出放凉后加入 30 ml 蒸馏水。

氨的蒸馏：

采用全自动定氮仪时，按仪器本身常量程序进行测定。

采用半自动定氮仪时，将带消化液的管子插在蒸馏装置上，以 25 ml 硼酸为吸收液，加入 2 滴混合指示剂，蒸馏装置的冷凝管末端要浸入装有吸收液的锥形瓶内，然后向消煮管中加入 50 ml 氢氧化钠溶液进行蒸馏。蒸馏时间以吸收液体积达到 100ml 时为宜。降下锥形瓶。用蒸馏水冲洗冷凝管末端，洗液均需流入锥形瓶内。

滴定：用 0.1 mol/l 的标准盐酸溶液滴定吸收液，溶液由蓝绿色变成灰红色为终点。

空白测定

称取蔗糖 0.5 g 代替样品，进行空白测定，消耗 0.1 mol/l 盐酸标准溶液的体积不得超过 0.2ml。消耗 0.02 mol/l 盐酸标准溶液的体积不得超过 0.3 ml。

结果计算：

$$P(\%) = \frac{(V_2 - V_1) \times C \times 0.0140 \times 6.25}{m \times \frac{V'}{V}} \times 100$$

式中：P——粗蛋白质，%

V_2 ——滴定样品时所需标准酸溶液体积，ml

V_1 ——滴定空白时所需标准酸溶液体积，ml

C ——盐酸标准溶液浓度，mol/l

m ——样品质量，g

V ——样品分解液总体积，ml

V' ——样品分解液蒸馏用体积，ml

0.0140——每毫克当量氮的克数

6.25——氮换算成蛋白质的平均系数

允许差：每个样品取两个平行样进行测定，以其算术平均值为结果。当粗蛋白质含量在 25%以上时，允许相对偏差为 1%；当粗蛋白质含量在 10%~25%之间时，允许相对偏差为 2%；当粗蛋白质含量在 10%以下时，允许相对偏差为 3%。

6.3 粗脂肪含量

三叶草样品中粗脂肪占干物质的百分比。开花期采样。按照 BG/T 6433—1994 饲料粗脂肪测定方法进行。以%表示，精确到 0.01%。

试剂

无水乙醚(分析纯)。

仪器设备

- ①实验室用样品粉碎机或研钵；
- ②分样筛：孔径 0.45mm；
- ③分析天平：感量 0.0001g；
- ④电热恒温水浴锅：室温~100℃；
- ⑤恒温烘箱：50~200℃；
- ⑥索氏脂肪提取器(带球形冷凝管)：100 或 150ml；
- ⑦索氏脂肪提取仪；
- ⑧滤纸或滤纸筒：中速，脱脂；
- ⑨干燥器：用氯化钙(干燥级)或变色硅胶为干燥剂。

样品的制备

选取有代表性的样品，用四分法将样品缩减至 500g，粉碎至 40 目。再用四分法缩减至 200g，于密封容器中保存。

分析步骤

①仲裁法：使用索氏脂肪提取器测定。

索氏提取器(6.3.2.6)应干燥无水。抽提瓶(内有沸石数粒)在 105±2℃烘箱中烘干 60min，干燥器中冷却 30min，称重。再烘干 30min，同样冷却称重，两次重量之差小于 0.0008g 为恒重。

称取样品 1~5g(准确至 0.0002g)，于滤纸筒中，或用滤纸包好，放入 105℃

烘箱中，烘干 120min(或称测水分后的干样品，折算成风干样重)，滤纸筒应高于提取器虹吸管的高度，滤纸包长度应以可全部浸泡于乙醚中为准。将滤纸筒或包放入抽提管，在抽提瓶中加入无水乙醚 60~100mL，在 60~75℃的水浴(用蒸馏水)上加热，使乙醚回流，控制乙醚回流次数为每小时约 10 次，共回流约 50 次或检查抽提管流出的乙醚挥发后不留下油迹为抽提终点。

取出样品，仍用原提取器回收乙醚直至抽提瓶全部收完，取下抽提瓶，在水浴上蒸去残余乙醚。擦净瓶外壁。将抽提瓶放入 105±2℃烘箱中烘干 120 min，干燥器中冷却 30min 称重，再烘干 30min，同样冷却称重，两次重量之差小于 0.001g 为恒重。

②推荐法：使用脂肪提取仪测定。依各仪器操作说明书进行测定。

结果计算：

$$F(\%) = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100$$

式中：F——粗脂肪，%

m ——风干样品重量，g

m_1 ——已恒重的抽提瓶重量，g

m_2 ——已恒重的盛有脂肪的抽提瓶重量，g

允许差：每个样品取两平行样进行测定，以其算术平均值为结果。粗脂肪含量在 10%以上(含 10%)时，允许相对偏差为 3%；粗脂肪含量在 10%以下时，允许相对偏差为 5%。

6.4 粗纤维含量

三叶草样品中粗纤维占干物质的百分比。开花期采样。按照 GB/T 6434—1994 饲料中粗纤维测定方法进行。以%表示，精确到 0.01%。

试剂

本方法试剂使用分析纯，水为蒸馏水。标准溶液按 GB 601 制备。

①硫酸(GB 625)溶液 0.128 ± 0.005 mol/l；

氢氧化钠标准溶液标定，GB 601；

②氢氧化钠(GB 629)溶液，0.313 ± 0.005 mol/l；

邻苯二甲酸氢钾法标定 GB 601；

③酸洗石棉 HG 3—1062;

④95%乙醇(GB 679);

⑤乙醚(HG 3—1002);

⑥正辛醇(防泡剂)。

仪器设备

①实验室用样品粉碎机;

②分样筛: 孔径 1mm, (18 目);

③分析天平(感量 0.0001g);

④电加热器(电炉,可调节温度);电热恒温箱(烘箱,可控制温度在 130℃);

⑤高温炉: 有高温计可控制温度在 500~600℃;

⑥消煮器: 有冷凝球的 600 ml 高型烧杯或有冷凝管的锥形瓶;

⑦抽滤装置: 抽真空装置, 吸滤瓶和漏斗。滤器使用 200 目不锈钢网或尼龙滤布;

⑧古氏坩埚: 30 ml, 预先加入酸洗石棉悬浮液 30 ml (内含酸洗石棉 0.2~0.3 g) 再抽干, 以石棉厚度均匀, 不透光为宜。上下铺两层玻璃纤维有助于过滤;

⑨干燥器(以氯化钙或变色硅胶为干燥剂);

⑩粗纤维测定仪器: 国内外生产的符合本标准测定原理, 且测定结果一致的仪器。

样品制备

将样品用四分法缩减至 200 g, 粉碎, 全部通过 1 mm 筛, 放入密封容器。

分析步骤

①仲裁法

称取 1~2g 样品, 准确至 0.0002g, 用乙醚脱脂(含脂肪小于 10%可不脱脂), 放入消煮器, 加浓度准确且已沸腾的硫酸溶液 200 ml 和 1 滴正辛醇, 立即加热, 应使其在 2min 内沸腾, 调整加热器, 使溶液保持微沸, 且连续微沸 30min, 注意保持硫酸浓度不变。样品不应离开溶液沾到瓶壁上。随后抽滤, 残渣用沸蒸馏水洗至中性后抽干。用浓度准确且已沸腾的氢氧化钠溶液将残渣转移至原容器中并加至 200ml, 同样准确微沸 30min, 立即在铺有石棉的古氏坩埚上过滤,

先用 25ml 硫酸溶液洗涤，残渣无损失地转移到坩埚中，用沸蒸馏水洗至中性，再用 15ml 乙醇洗涤，抽干。将坩埚放入烘箱，于 $130 \pm 2^\circ\text{C}$ 下烘干 2h，取出后在干燥器中冷却至室温，称重，再于 $550 \pm 25^\circ\text{C}$ 高温炉中灼烧 30min，取出后于干燥器中冷却至室温后称重。

②推荐法

称 1~2g 样品(脱脂步骤同手工方法)于 G_2 玻璃沙漏斗中，用坩埚夹将漏斗插入热萃取器；从顶部加入预先煮沸的硫酸溶液 200 ml 和两滴正辛醇，将加热旋钮开到最大位置，待溶液沸腾后，将旋钮调到合适位置，使溶液保持微沸 30min，抽滤，用沸蒸馏水洗至中性，加入预先煮沸的氢氧化钠溶液 200ml，同样准确微沸 30 min，抽滤，用沸蒸馏水洗至中性，将坩埚转移至冷萃取器，加入 25 ml 95%乙醇，抽干，将漏斗转移到烘箱，于 $130 \pm 2^\circ\text{C}$ 下烘干 2h，取出后在干燥器中冷却至室温，称重。再放入 $500 \pm 25^\circ\text{C}$ 高温炉中灼烧 1h，干燥器中冷却至室温后称重。型号不同的仪器具体操作步骤见该仪器使用说明书。

结果计算：

$$F(\%) = \frac{m_1 - m_2}{m} \times 100$$

式中：F——粗纤维，%

m_1 —— 130°C 烘干后坩埚及样品残渣重，g

m_2 —— 550°C (或 500°C) 灼烧后坩埚及样品残渣重，g

m ——试样(未脱脂)质量，g

允许差：每个样品取两平行样进行测定，以算术平均值为结果。粗纤维含量在 10%以下，绝对值相差 0.4；粗纤维含量在 10%以上，相对偏差为 4%。

6.5 无氮浸出物含量

三叶草样品中无氮浸出物占干物质的百分比。开花期采样。种质样品中无氮浸出物含量的计算方法为：从 100%的干物质中分别减去水分的百分含量、粗蛋白质的百分含量、粗脂肪的百分含量、粗纤维的百分含量以及粗灰分的百分含量，剩余的值即为无氮浸出物含量。以%表示，精确到 0.01%。

6.6 粗灰分含量

三叶草样品中粗灰分占干物质的百分比。开花期采样，按照 GB/T 6438—1992

饲料中粗灰分的测定方法进行。以%表示，精确到 0.01%。

仪器与设备

- ①实验室用样品粉碎机或研钵；
- ②分样筛：孔径 0.45 mm(40 目)；
- ③分析天平：分度值 0.0001 g；
- ④高温炉：有高温计且可控制炉温在 $550 \pm 20^\circ\text{C}$ ；
- ⑤坩埚（瓷质）：容积 50 ml；
- ⑥干燥器：用氯化钙（干燥试剂）或变色硅胶作干燥剂；

样品的选取和制备

取具有代表性样品，粉碎至 40 目。用四分法缩减至 200 g，装于密封容器。防止样品的成分变化或变质。

测定步骤

将干净坩埚放入高温炉，在 $550 \pm 20^\circ\text{C}$ 下灼烧 30 min。取出，在空气中冷却约 1 min，放入干燥器冷却 30 min，称其质量。再重复灼烧，冷却、称量，直至两次质量之差小于 0.0005 g 为恒质。

在已恒质的坩埚中称取 2~5 g 试料(灰分质量 0.05 g 以上)，准确至 0.0002 g，在电炉上小心炭化，在炭化过程中，将试料在较低温度状态加热灼烧至无烟，尔后升温灼烧至样品无炭粒，再放入高温炉，于 $550 \pm 20^\circ\text{C}$ 下灼烧 3 h。取出，在空气中冷却约 1 min，放入干燥器中冷却 30 min，称取质量。再同样灼烧 1 h，冷却，称量，直至两次质量之差小于 0.001 g 为恒重。

结果计算：

$$A(\%) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

式中：A——粗灰分，%

m_0 ——为恒质空坩埚质量，g

m_1 ——为坩埚加样品的质量，g

m_2 ——为灰化后坩埚加灰分的质量，g

允许差：每个样品应分两份进行测定，以其算术平均值为分析结果。

粗灰分含量在 5%以上，允许相对偏差为 1%；粗灰分含量在 5%以下，允许相对偏

差为 5%。

6.7 磷含量

三叶草样品中磷占干物质的百分比。开花期采样。按照国家标准 GB/T 6437—2002 饲料中总磷的测定分光光度法进行。以%表示，精确到 0.01%。

试剂

实验室用水应符合 GB/T 6682 中三级水的规格。本标准中所用试剂，除特殊说明外，均为分析纯。

①盐酸溶液：1+1；

②硝酸；

③高氯酸；

④钒钼酸铵显色剂：称取偏钒酸铵 1.25 g，加水 200 ml 加热溶解，冷却后再加入 250 ml 硝酸，另称取钼酸铵 25 g，加水 400 ml 加热溶解，在冷却的条件下，将两种溶液混合，用水定容至 1000 ml，避光保存，若生成沉淀，则不能继续使用；

⑤磷标准液：将磷酸二氢钾在 105℃干燥 1h，在干燥器中冷却后称取 0.2195 g 溶解于水，定量转入 1 000 ml 容量瓶中，加硝酸 3 ml，用水稀释至刻度，摇匀。即为 50 μg/ml 的磷标准液。

仪器和设备：

①实验室用样品粉碎机或研钵；

②分样筛：孔径 0.42 mm(40 目)；

③分析天平：感量 0.0001g；

④分光光度计：可在 400nm 下测定吸光度；

⑤比色皿：1 cm；

⑥高温炉：可控温度在 550±20℃；瓷坩埚：50 ml；

⑦容量瓶：50、100、1 000 ml；

⑧移液管（1.0、2.0、5.0、10.0 ml）；三角瓶：200 ml；

⑨凯氏烧瓶：125、250 ml；

⑩可调温电炉：1000 W。

样品制备

取具有代表性样品 2 Kg，用四分法缩分至 250 g，粉碎过 0.42mm 孔筛，装入样品瓶中，密封保存备用。

测定步骤

①样品分解：

干法：称取样品 2g~5g（精确至 0.0002g）于坩埚中，在电炉上小心炭化，再放入高温炉，于 550℃ 下灼烧 3h（或测定粗灰分后继续进行），取出冷却，加入 10ml 盐酸溶液和硝酸数滴，小心煮沸约 10min，冷却后转入 100ml 容量瓶中，用蒸馏水稀释至刻度，摇匀，为样品分解液。

湿法：称取样品 0.5g~5g（精确至 0.0002g）于凯氏烧瓶中，加入硝酸 30ml，小心加热煮沸至黄烟逸尽，稍冷，加入高氯酸 10ml，继续加热至高氯酸冒白烟（不得蒸干），溶液基本无色，冷却，加蒸馏水 30ml，加热煮沸，冷却后，用水转移入 100ml 容量瓶中，并稀释至刻度，摇匀，为样品分解液。

②工作曲线的绘制：准确移取磷标准液 0.0、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0ml 于 50ml 容量瓶中，各加钒钼酸铵显色剂 10ml，用水稀释到刻度，摇匀，常温下放置 10min 以上，以 0.0 ml 溶液为参比，用 1cm 比色皿，在 400nm 波长下用分光光度计测各溶液的吸光度。以磷含量为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制工作曲线。

③样品的测定：准确移取样品分解液 1.0ml~10.0ml（含磷量 50 μg~750 μg）于 50ml 容量瓶中，加入钒钼酸铵显色剂 10ml，用蒸馏水稀释到刻度，摇匀，常温下放置 10min 以上，用 1cm 比色皿在 400nm 波长下测定样品分解液的吸光度，在工作曲线上查得样品分解液的磷含量。

结果计算：

$$P(\%) = \frac{m_1 \times V}{m \times V_1 \times 10^6} \times 100 = \frac{m_1 \times V}{m \times V_1 \times 10^4}$$

式中：P——磷含量，%

m_1 ——由工作曲线查得样品分解液磷含量，μg

V ——样品分解液的总体积，ml

m ——样品的质量，g

V_1 ——样品测定时移取样品分解液体积，ml

允许差：每个样品称取两个平行样进行测定，以其算术平均值为测定结果。
含磷量 0.5%以下，允许相对偏差 10%；含磷量 0.5%以上，允许相对偏差 3%。

6.8 钙含量

三叶草样品中钙占干物质的百分比。开花期采样。测定采用高锰酸钾法（仲裁法）或乙二胺四乙酸二钠络合滴定法，按照国家标准 GB/T 6436—2002 饲料中钙的测定进行，以%表示，精确到 0.01%。

高锰酸钾法(仲裁法)

试剂和溶液

实验用水应符合 GB/T 6682 中三级用水规格，使用试剂除特殊规定外均为分析纯。

- ①硝酸；
- ②高氯酸：70%~72%；
- ③盐酸溶液：1+3；
- ④硫酸溶液：1+3；
- ⑤氨水溶液：1+1；
- ⑥草酸铵水溶液(42g/l)：称取 4.2g 草酸铵溶于 100 ml 水中；
- ⑦高锰酸钾标准溶液 $[c(1/5 \text{ KMnO}_4)=0.05 \text{ mol/l}]$ 的配制按 GB/T 601 规定；
- ⑧甲基红指示剂(1g/l)：称取 0.1g 甲基红溶于 100 ml 95%乙醇中。

仪器和设备：

- ①实验室用样品粉碎机或研钵；
- ②分析筛：孔径 0.42 mm(40 目)；
- ③分析天平：感量 0.0001g；
- ④高温炉：电加热，可控温度在 $550 \pm 20^\circ\text{C}$ ；坩埚（瓷质）；
- ⑤容量瓶：100ml；滴定管：酸式, 25ml 或 50ml；
- ⑥玻璃漏斗：直径 6cm；
- ⑦定量滤纸：中速, 7cm~9cm；
- ⑧移液管：10, 20ml；
- ⑨烧杯：200ml；
- ⑩凯氏烧瓶：250ml 或 500ml。

样品制备

取具有代表性样品至少 2Kg，用四分法缩减至 250 g，粉碎过 0.42mm 孔筛，混匀，装入样品瓶中，密闭，保存备用。

测定步骤

①样品分解：

干法：称取样品 2g~5g 于坩埚中，精确到 0.0002g，在电炉上小心炭化，再放入高温炉于 550℃ 下灼烧 3h（或测定粗灰分后连续进行），在盛灰坩埚中加入盐酸溶液 10ml 和浓硝酸数滴，小心煮沸，将此溶液转入 100ml 容量瓶中，冷却至室温，用蒸馏水稀释至刻度，摇匀，为样品分解液。

湿法：称取样品 2g~5g 于 250ml 凯氏烧瓶中，精确到 0.0002g，加入硝酸 10ml，加热煮沸，至二氧化氮黄烟逸尽，冷却后加入高氯酸 10ml，小心煮沸至溶液无色，不得蒸干（危险），冷却后加蒸馏水 50ml，且煮沸驱逐二氧化氮，冷却后移入 100ml 容量瓶中，用蒸馏水稀释至刻度，摇匀，为样品分解液。

②样品的测定：准确移取样品液 10ml~20ml（含钙量 20mg 左右）于 200ml 烧杯中，加蒸馏水 100ml，甲基红指示剂 2 滴，滴加氨水溶液至溶液呈橙色，若滴加过量，可加盐酸溶液调至橙色，再多加 2 滴使其呈粉红色（pH 2.5~3.0），小心煮沸，慢慢滴加热草酸铵溶液 10ml，且不断搅拌，如溶液变橙色，则应加补盐酸溶液使其呈红色，煮沸数分钟，放置过夜使沉淀陈化（或在水浴上加热 2h）。用定量滤纸过滤，1+50 的氨水溶液洗沉淀 6~8 次，至无草酸根离子（接滤液数毫升加硫酸溶液数滴，加热至 80℃，再加高锰酸钾溶液 1 滴，呈微红色，且半分钟不退色）。将沉淀和滤纸转入原烧杯中，加硫酸溶液 10ml，蒸馏水 50ml，加热至 75~80℃，用高锰酸钾标准溶液滴定，溶液呈粉红色，且半分钟不退色为终点。

同时进行空白溶液的测定。

结果计算：

$$\text{Ca}(\%) = \frac{(V - V_0) \times c \times 0.02}{m \times \frac{V'}{100}} \times 100 = \frac{(V - V_0) \times c \times 200}{m \times V'}$$

式中：Ca——含钙量，%

V——样品消耗高锰酸钾标准溶液的体积，ml

V_0 ——空白消耗高锰酸钾标准溶液的体积, ml

C ——高锰酸钾标准溶液的浓度, mol/l

V' ——滴定时移取样品分解液体积, ml

m ——样品质量, g

0.02 ——与 1.00mL 高锰酸钾标准溶液 [$c(1/5 \text{ KMnO}_4)=1.000\text{mol/l}$]

相当的以克表示的钙的质量。

允许差: 每个样品取两个平行样进行测定, 以其算术平均值为结果。含钙量 10%以上, 允许相对偏差 2%; 含钙量在 5%~10%时, 允许相对偏差 3%; 含钙量 1%~5%时, 允许相对偏差 5%; 含钙量 1%以下, 允许相对偏差 10%。

乙二胺四乙酸二钠络合滴定法

用乙二胺四乙酸二钠标准溶液络合滴定钙, 可快速测定钙的含量。

试剂和溶液

实验用水应符合 GB/T 6682 中三级用水规格, 使用试剂除特殊规定外均为分析纯。

①盐酸羟胺;

②三乙醇胺;

③乙二胺;

④盐酸水溶液: 1+3;

⑤氢氧化钾溶液(200g/l): 称取 20 g 氢氧化钾溶于 100 ml 水中;

⑥淀粉溶液(10g/l): 称取 1 g 可溶性淀粉入 200 ml 烧杯中, 加 5 ml 水润湿, 加 95 ml 沸水搅拌, 煮沸, 冷却备用(现用现配);

⑦孔雀石绿水溶液(1g/l);

⑧钙黄绿素—甲基百里香草酚蓝指示剂: 0.10 g 钙黄绿素与 0.10 g 甲基麝香草酚蓝与 0.03 g 百里香草酚酞、5 g 氯化钾研细混匀, 贮存于磨口瓶中备用;

⑨钙标准溶液(0.0010g/ml): 称取 2.4974 g 于 105℃~110℃干燥 3 h 的基准物碳酸钙, 溶于 40 ml 盐酸中, 加热赶除二氧化碳, 冷却, 用水移至 1 000 ml 容量瓶中, 稀释至刻度;

⑩乙二胺四乙酸二钠(EDTA)标准滴定溶液: 称取 3.8 g EDTA 入 200ml 烧杯中, 加 200 ml 水, 加热溶解冷却后转至 1 000ml 容量瓶中, 用水稀释至刻度;

EDTA 标准滴定溶液的标定：准确吸取钙标准溶液 10.0 ml 按样品测定法进行滴定；

EDTA 滴定溶液对钙的滴定度按下式计算： $T = \frac{\rho \times V}{V_0}$

式中： T ——EDTA 标准滴定溶液对钙的滴定度，g/ml

ρ ——钙标准溶液的质量浓度，g/ml

V ——所取钙标准溶液的体积，ml

V_0 ——EDTA 标准滴定溶液的消耗体积，ml

所得结果应表示至 0.0001 g/ml

仪器和设备：同高锰酸钾法。

测定步骤

①样品分解：同高锰酸钾法。

②测定：准确移取样品分解液 5 ml~25 ml (含钙量 2 mg~25 mg)。加水 50ml，加淀粉溶液 10 ml、三乙醇胺 2 ml、乙二胺 1 ml、1 滴孔雀石绿，滴加氢氧化钾溶液至无色，再过量 10 ml，加 0.1 g 盐酸羟胺（每加一种试剂都须摇匀），加钙黄绿素少许，在黑色背景下立即用 EDTA 标准滴定溶液滴定至绿色荧光消失呈现紫红色为滴定终点。同时做空白实验。

结果计算：

$$\text{Ca}(\%) = \frac{T \times V_2}{m \times \frac{V_1}{V_0}} \times 100 = \frac{T \times V_2 \times V_0}{m \times V_1} \times 100$$

式中： Ca ——含钙量，%

T ——EDTA 标准滴定溶液对钙的滴定度，g/ml

V_0 ——样品分解液的总体积，ml

V_1 ——取样品分解液的体积，ml

V_2 ——样品实际消耗 EDTA 标准滴定溶液的体积，ml

m ——样品的质量，g

允许差：每个样品取两个平行样进行测定，以其算术平均值为结果。含钙量 10%以上，允许相对偏差 2%；含钙量在 5%~10%时，允许相对偏差 3%；含钙量 1%~5%时，允许相对偏差 5%；含钙量 1%以下，允许相对偏差 10%。

6.9 维生素含量

开花期采样。三叶草样品中维生素 A、D3、E、K3 的测定：参照《饲料分析及饲料质量检测技术》（第 2 版）所介绍的(HPLC 法)测定。以 mg/kg 表示，精确到 0.01。

三叶草样品中维生素 B6 测定方法：用水提取，在 pH7 条件下，用荧光法测定维生素 B6。参照 GB/T 14702—93。以 mg/kg 表示，精确到 0.01。

三叶草样品中维生素 B2 测定方法：维生素 B2 在 440nm 紫外光激发下产生绿色荧光，在一定浓度范围内其荧光强度与核黄素浓度成正比。用连二亚硫酸钠还原核黄素成无荧光物质，由还原前后荧光强度之差与内标荧光强度的比值，计算样品核黄素的含量。参照 GB / T 14701—93。以 mg/kg 表示，精确到 0.01。

三叶草样品中维生素 B1 测定方法：试样中的维生素 B1 经稀酸消化、酶分解、吸附剂的吸附分离提纯后，在碱性条件下被铁氰化钾氧化生成荧光色素—硫色素，用正丁醇萃取。硫色素在正丁醇中的荧光强度与试样中维生素 B1 的含量成正比，依此进行定量测定。参照 GB / T 14700—93。以 mg/kg 表示，精确到 0.01。。

6.10 氨基酸含量

三叶草样品中氨基酸总量占干物质的百分比。开花期采样。按照 GB/T 18246—2000 饲料中氨基酸的测定方法进行。以%表示，精确到 0.01%。

仪器、设备

- ①实验室用样品粉碎机；
- ②样品筛：孔径 0.25 mm；
- ③分析天平：感量 0.0001 g；
- ④真空泵与真空规；
- ⑤喷灯或熔焊机；
- ⑥恒温箱或水解炉；
- ⑦旋转蒸发器或浓缩器：可在室温至 65℃间调温，控温精度±1℃，真空度可低至 3.3×10^3 Pa (25 mm 汞柱)；
- ⑧氨基酸自动分析仪：茚三酮柱后衍生离子交换色谱仪，要求各氨基酸的分辨率大于 90% 。

试剂和材料

除特别注明者外,所有试剂均为分析纯,水为去离子水,电导率小于 1 S/m。

①酸水解法:

常规水解:

酸解剂——盐酸溶液, $c(\text{HCl})=6 \text{ mol/l}$: 将优级纯盐酸与水等体积混合;
液氮或干冰-乙醇(丙酮);

稀释上机用柠檬酸钠缓冲液, $\text{pH}2.2$, $c(\text{Na}^+)=0.2 \text{ mol/l}$: 称取柠檬酸三钠 19.6 g, 用水溶解后加入优级纯盐酸 16.5 ml, 硫二甘醇 5.0 ml, 苯酚 1 g, 加水定容至 1 000 ml, 摇匀, 用 G4 垂熔玻璃砂芯漏斗过滤, 备用;

不同 pH 和离子强度的洗脱用柠檬酸钠缓冲液: 按仪器说明书配制;

茚三酮溶液: 按仪器说明书配制;

氨基酸混合标准储备液: 含 L-天门冬氨酸、L-苏氨酸等 17 种常规蛋白水解液分析用层析纯氨基酸, 各组分浓度 $c(\text{氨基酸})=2.50$ (或 2.00) $\mu\text{mol/ml}$;

混合氨基酸标准工作液: 吸取一定量的氨基酸混合标准储备液置于 50 ml 容量瓶中, 以稀释上机用柠檬酸钠缓冲液定容, 混匀, 使各氨基酸组分浓度 $c(\text{氨基酸})=100 \text{ nmol/ml}$ 。

氧化水解: 按 GB/T 15399—1994 中 7.1 氧化水解步骤操作。

②碱水解法:

碱解剂——氢氧化锂溶液 $c(\text{LiOH})=4 \text{ mol/l}$: 称取一水合氢氧化锂 167.8 g, 用水溶解并稀释至 1 000 ml, 使用前取适量超声或通氮脱气;

液氮或干冰-乙醇(丙酮);

盐酸溶液, $c(\text{HCl})=6 \text{ mol/l}$: 将优级纯盐酸与水等体积混合;

稀释上机用柠檬酸钠缓冲液, $\text{pH}4.3$, $c(\text{Na}^+)=0.2 \text{ mol/l}$: 称取柠檬酸三钠 14.71 g、氯化钠 2.92 g 和柠檬酸 10.50 g, 溶于 500 ml 水, 加入硫二甘醇 5 ml 和辛酸 0.1 ml, 最后定容至 1 000 ml;

不同 pH 和离子强度的洗脱用柠檬酸钠缓冲液与茚三酮溶液(按仪器说明书配制);

L-色氨酸标准储备液: 准确称取层析纯 L-色氨酸 102.0 mg, 加少许水和数滴 0.1 mol/l 氢氧化钠, 使之溶解, 定量地转移至 100 ml 容量瓶中, 加水至刻

度。 $c(\text{色氨酸}) = 5.00 \mu\text{mol/ml}$;

氨基酸混合标准储备液：含 L-天门冬氨酸、L-苏氨酸等 17 种常规蛋白水解液分析用层析纯氨基酸，各组分浓度 $c(\text{氨基酸}) = 2.50$ (或 2.00) $\mu\text{mol/ml}$;

混合氨基酸标准工作液：准确吸取 2.00 ml L-色氨酸标准储备液和适量的氨基酸混合标准储备液，置于 50 ml 容量瓶中并用 pH4.3 稀释上机用柠檬酸钠缓冲液定容。该液色氨酸浓度为 200 nmol/ml ，而其他氨基酸浓度为 100 nmol/ml 。

③酸提取法：

提取剂——盐酸溶液， $c(\text{HCl}) = 0.1 \text{ mol/l}$ ：取 8.3 mL 优级纯盐酸，用水定容至 1000 ml ，混匀；

不同 pH 和离子强度的洗脱用柠檬酸钠缓冲液：按仪器说明书配制；

茚三酮溶液：按仪器说明书配制；

蛋氨酸、赖氨酸和苏氨酸标准储备液：于三只 100 ml 烧杯中，分别称取蛋氨酸 93.3 mg 、赖氨酸盐酸盐 114.2 mg 和苏氨酸 74.4 mg ，加水约 50 ml 和数滴盐酸溶解，定量地转移至各自的 250 ml 容量瓶中，并用水定容。该液各氨基酸浓度 $c(\text{氨基酸}) = 2.50 \mu\text{mol/ml}$ ；

混合氨基酸标准工作液：分别吸取蛋氨酸、赖氨酸和苏氨酸标准储备液各 1.00 ml 于同一 25 ml 容量瓶中，用水稀释至刻度。该液各氨基酸的浓度 $c(\text{氨基酸}) = 100 \text{ nmol/ml}$ 。

样品

取具有代表性样品，用四分法缩减分取 25 g 左右，粉碎并过 0.25 mm 孔径 (60 目) 筛，充分混匀后装入磨口瓶中备用；

酸水解样品按 GB/T 6432 测定蛋白质含量；

碱水解样品按 GB/T 6433 测定粗脂肪含量；

对于粗脂肪含量大于、等于 5% 的样品，需将脱脂后的样品风干、混匀，装入密闭容器中备用。而对粗脂肪小于 5% 的样品，则可直接称用未脱脂样品。

分析步骤

①样品前处理：

酸水解法：

常规水解法：称取含蛋白 $7.5 \sim 25 \text{ mg}$ 的试样 (约 $50 \sim 100 \text{ mg}$ ，准确至 0.1 mg) 于 20 ml 安瓿中，加 20.00 ml 酸解剂，置液氮或干冰 (丙酮) 中冷冻，然

后，抽真空至 7 Pa ($\leq 5 \times 10^{-2}$ mm 汞柱) 后封口。将水解管放在 $110 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温干燥箱中，水解 22~24 h。冷却，混匀，开管，过滤，用移液管吸取适量的滤液，置旋转蒸发器或浓缩器中， 60°C ，抽真空，蒸发至干，必要时，加少许水，重复蒸干 1~2 次。加入 3~5 ml pH2.2 稀释上机用柠檬酸钠缓冲液，使样液中氨基酸浓度达 50~250 nmol/ml，摇匀，过滤或离心。取上清液上机测定。

氧化水解法：按 GB/T 15399—1994 中 7.1 规定操作。

碱水解法：称取 50~100mg 的试样（准确至 0.1 mg），置于聚四氟乙烯衬管中，加 1.50 ml 碱解剂，于液氮或干冰乙醇（丙酮）中冷冻，而后将衬管插入水解玻管，抽真空至 7 Pa ($\leq 5 \times 10^{-2}$ mm 汞柱)，或充氮（至少 5min），封管。然后，将水解管放入 $110 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温干燥箱，水解 20h。取出水解管，冷至室温，开管，用稀释上机用柠檬酸钠缓冲液将水解液定量地转移到 10 ml 或 25 ml 容量瓶中，加入盐酸溶液约 1.00ml 中和，并用上述缓冲液定容。离心或用 0.45 μm 滤膜过滤后，取清液贮于冰箱中，供上机测定使用。

酸提取法：称取 1~2 g 试样（蛋氨酸含量 ≤ 4 mg，赖氨酸可略高），加 0.1 mol/l 盐酸提取剂 30 ml，搅拌提取 15 min，沉放片刻，将上清液过滤到 100 ml 容量瓶中，残渣加水 25 ml，搅拌 3 min，重复提取两次，再将上清液过滤到上述容量瓶中，用水冲洗提取瓶和滤纸上的残渣，并定容。摇匀，清液供上机测定。若试样提取过程中，过滤太慢，也可离心 10 min (4000 r/min)。

②测定

用相应的混合氨基酸标准工作液按仪器说明书，调整仪器操作参数和（或）洗脱用柠檬酸钠缓冲液的 pH，使各氨基酸分辨率 $\geq 85\%$ ，注入制备好的试样水解液和相应的氨基酸混合标准工作液，进行分析测定。酸解液每 10 个单样为一组，碱解液和酸提取液每 6 个单样为一组，组间插入混合氨基酸标准工作液进行校准。

结果计算：分别用式(1)和式(2)计算氨基酸在试样中的质量百分比。

$$\omega_{1i} (\%) = \frac{A_{1i}}{m} \times 10^{-6} \times D \times 100 \quad (1)$$

$$\omega_2 (\%) = \frac{A_2}{m} \times (1 - F) \times 10^{-6} \times D \times 100 \quad (2)$$

式中： ω_{1i} ——用未脱脂试样测定的某氨基酸的含量，%

ω_2 ——用脱脂试样测定的某氨基酸的含量，%

A_{1i} ——每毫升上机水解液中氨基酸的含量，ng

A_2 ——每毫升上机液中色氨酸的含量，ng

m ——试样质量，mg

D ——试样稀释倍数

F ——样品中的脂肪含量，%

允许差：以两个平行试样测定结果的算术平均值报告结果。对于酸解或酸提取液测定的氨基酸，当含量小于或等于 0.5%时，两个平行试样测定值的相对偏差不大于 5%；含量大于 0.5%时，相对偏差不大于 4%。对于色氨酸，当含量小于 0.2%时，两个平行试样测定值相对偏差不大于 0.03%；含量大于、等于 0.2%时，相对偏差不大于 5%。

用上述方法可以同时测出如下 17 种氨基酸的含量：天门冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、胱氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸。

色氨酸的测定方法与上述 17 种氨基酸的测定有所不同，采用反相高效液相色谱（RP-HPLC）法。仪器、缓冲液和测定条件做如下变换：

反相液相色谱仪：具适当内径、长度和柱材粒度的 C18 柱、紫外（UV）或荧光检测仪。

流动相：乙酸钠缓冲液 $c(\text{Na}^+) = 0.0085 \text{ mol/l}$ 的乙酸钠溶液用乙酸调节 pH 至 4.0，用 $0.45 \mu\text{m}$ 的滤膜过滤+甲醇=95+5。

测定

条件：柱温为室温；流动相流速为 1.5ml/min；

检测：紫外检测波长为 280nm；

荧光检测：激发波长为 283nm；发射波长为 343nm；

进样量：15 μl 。

其它所用设备及试剂、样品前处理、结果计算和允许差等均同上述 17 种氨基酸的测定方法。先从混合氨基酸标准工作液开始分析，每 6 个水解液为一组，组间插入氨基酸标准工作液进行校准。

6.11 消化能

根据动物食入三叶草的总能、排除的粪能直接测定。

$$\text{消化能 (MJ/kg)} = \frac{\text{试验期食入三叶草总能(MJ)} - \text{试验期排除的粪能(MJ)}}{\text{试验期食入三叶草量 (kg)}}$$

反刍动物三叶草消化能测定较为方便、准确地方法为离体的人工瘤胃法，在实验室内，使用模拟反刍动物瘤胃微生态环境的特殊装置，评定饲料营养价值的方法。方法参照《饲料生物学效价评定方法》进行，以 MJ/kg 表示，精确到 0.01。

对于单胃动物而言,通常采用全收粪法来测定消化能，参照《饲料分析及饲料质量检测技术》(第 2 版)进行，以 MJ/kg 表示，精确到 0.01。

6.12 代谢能

反刍动物三叶草代谢能测定方法：

反刍动物三叶草代谢能测定的简易方法是产气法。参照《饲料生物学效价评定方法》进行，以 MJ/kg 表示，精确到 0.01。

单胃动物三叶草代谢能测定方法：

对于单胃动物而言,通常采用全收粪法来测定消化能，参照《饲料分析及饲料质量检测技术》(第 2 版)进行。在消化试验的基础上增加收集尿液的装置即可测出代谢能，一般猪采用粪、尿分离代谢装置。参照《饲料生物学效价评定方法》进行。以 MJ/kg 表示，精确到 0.01。

6.13 中性洗涤纤维

应用中性洗涤剂分析饲料，使植物性饲料中大部分细胞内容物溶解于洗涤剂中，包括脂肪、糖、淀粉和蛋白质，剩余的不溶解残渣主要是细胞壁成分，称之为中性洗涤纤维（NDF）。参照《饲料分析及饲料质量检测技术》(第 2 版)所介绍的范氏中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维的测定方法，以干物质中的%表示，精确到 0.01%。

6.14 酸性洗涤纤维

应用酸性洗涤剂可将 NDF 进一步细分。植物性饲料中可溶于酸性洗涤剂的部分称为酸性洗涤剂溶解物，剩余的残渣称之为酸性洗涤纤维（ADF）。参照《饲料分析及饲料质量检测技术》(第 2 版)所介绍的范氏中性洗涤纤维和酸性洗涤

纤维的测定方法，以干物质中的%表示，精确到 0.01%。

6.15 样品分析单位

样品分析单位的全称。

6.16 茎叶质地

茎、叶的柔软性。在青鲜时用感观测试，分 3 级。

- 1 细嫩（无刺无毛，手抓青草或干草时柔软而无扎手感觉。）
- 2 中等（茎叶柔软度中等，感观测试居于 1 与 3 之间。）
- 3 粗硬（牧草秆硬叶糙，植物体多粗硬毛或具刺，手抓或触及时有扎手或刺痛感，用手折断其茎秆和枝叶难度大。）

6.17 适口性

牧草适口性的优劣是由多种因素所决定，如化学成份、发育时期、形态特点、家畜种类，牧草种类及植株部位等。采用直接观察与访问调查方法确定。

根据采食状况，将三叶草的适口性分 3 个等级。

- 1 喜食（一般情况下家畜都吃，但不专门从草群中挑选着吃。）
- 2 少食（一般情况下家畜很少采食，只有在某一时期才采食。）
- 3 不食（家畜不采食或极少采食。）

7 抗逆性

7.1 抗旱性（参考方法）

三叶草抗旱性鉴定有实地目测法、干旱胁迫法（盆栽法）、生理指标测定法（电导法）。

三叶草苗期抗旱性鉴定用两次干旱胁迫-复水法。

在长×宽×高 = 60cm×40cm×15cm 的塑料箱中，装入 10cm 厚的中等肥力（即单产在 200kg/亩左右）耕层土（壤土），灌水至田间持水量的 85%±5%，播种，覆土 2cm。在 20℃±5℃的条件下进行。幼苗长至三叶时停止供水，开始进行干旱胁迫。当土壤含水量降至田间持水量的 20%-15%时(壤土)复水，使土壤水分达到田间持水量的 80%±5%。复水 120h 后调查存活苗数，以叶片转呈鲜绿色者为存活。第一次复水后即停止供水，进行第二次干旱胁迫。当土壤含水量降至田间持水量的 20%-15%时，第二次复水，使土壤水分达到田间持水量的 80%

±5%。120h 后调查存活苗数，以叶片转呈鲜绿色者为存活。三次重复。

幼苗干旱存活率实测值的计算公式如下：

$$DS = \frac{(DS1 + DS2) \cdot 2^{-1}}{X_{TT} \cdot X_{DS1}^{-1} \cdot 100 + X_{DS2} \cdot X_{TT}^{-1} \cdot 100} \cdot 2^{-1}$$

式中：

DS --- 干旱存活率的实测值

DS1 --- 第一次干旱存活率

DS2 --- 第二次干旱存活率

$\overline{X_{TT}}$ --- 第一次干旱前三次重复总苗数的平均值

$\overline{X_{DS1}}$ --- 第一次复水后三次重复存活苗数的平均值

$\overline{X_{DS2}}$ --- 第二次复水后三次重复存活苗数的平均值

根据反复干旱下苗期干旱存活率将三叶草苗期抗旱性分为 5 级。

- 1 强 (干旱存活率 ≥70.0%)
- 2 较强 (干旱存活率 60.0% ~70.0%)
- 3 中等(干旱存活率 50.0% ~60.0%)
- 4 弱(干旱存活率 40.0%~50.0%)
- 5 最弱 (干旱存活率 <40.0%)

如采用其他方法，请标明方法及方法来源

7.2 抗寒性（参考方法）

三叶草抗寒性鉴定的方法和指标很多，但在大量的实际鉴定中，田间目测法、盆栽幼苗冷冻法、电导法是通常采用的方法和指标，其特点是操作方便，其结果更接近实际。故本标准推荐采用上述三种方法和指标进行三叶草抗寒性的鉴定和评价。上述三种方法适用于相同水分生态类型种间或种内种质材料的鉴定评价。

田间目测法

在初冬及早春季节调查植株冻害及越冬率。实验小区面积至少 20m²，采用目测法调查植株的越冬率。每个观察材料设 3 次重复（3 个小区），各小区采用 5 点取样法，每点于入冬枯黄前选取 20~30 株，定株挂牌标记，次年早春返青后，统计其越冬返青成活株数，计算越冬率。根据植株越冬率，将抗寒性分为 5 级，

分级标准如下:

- 1 强 (越冬率大于 90%者)
- 2 较强 (越冬率在 75%~90%者)
- 3 中等 (越冬率在 50%~74%者)
- 4 弱 (越冬率在 30%~49%者)
- 5 最弱 (越冬率小于 30%者)

盆栽幼苗冷冻法

将种子播在装有草炭和蛭石(3:1)的育苗盘内,育苗盘大小为 32×45×15cm,每份种质材料设 3 次重复,每个重复 20~30 株苗,株距 2.5cm,行距 6cm。置于人工气候室内育苗。出苗前温度 25℃,出苗后温度为白天 25~28℃,晚间 15~20℃,每天光照 16h,正常浇水。幼苗生长到 3~4 叶期时,置于 5~15℃,低温条件下胁迫 7~10d。观察幼苗的冷害症状,比较不同材料在冷害处理后的植株的存活率,以此评价不同材料的抗寒性。根据植株的存活率,将抗寒性分为 5 级:

- 1 强 (存活率在 81%以上者)
- 2 较强 (存活率在 61%~80%者)
- 3 中等 (存活率在 41%~60%者)
- 4 弱 (存活率在 20%~40%者)
- 5 最弱 (存活率在 20%以下者)

如采用其他方法,请标明方法及方法来源。

7.3 耐盐性(参考方法)

在苗期采用下列方法进行耐盐性评价鉴定。

取大田土壤(非盐碱地)过筛,用无孔塑料花盆(高 12.5cm、底径 12cm、口径 15.5cm),每盆装大田土 1.5kg,装土时,取样测定含水率以确定实际装入干土重。根据种子发芽率每盆播种 20-30 粒种子,出苗后间苗,3-4 叶期之前定苗,每盆留生长整齐一致,分布均匀的 10 棵苗。

按照土壤干重的百分比加化学纯 NaCl 进行盐处理,处理浓度依次为 0(CK)、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%NaCl(分析纯),将盐溶解在一定量的自来水中,使盐处理后的土壤含水率为最大持水量的 70%,加等量的自来水作对照,重复 3

次，即每个处理 3 个盆。盐处理后及时补充所蒸发的水分，使土壤含水量保持不变。

盐处理 30 天时结束试验，调查各处理的存活苗数，以相对于对照的百分率表示。根据耐盐性级别标准对参试三叶草种质资源的耐盐性进行鉴定与评价。

存活率 浓度	得分				
	1	2	3	4	5
0.2%	100.0	100.0~80.0	79.9~50.0	49.9~35.0	34.9~0.0
0.4%	100.0~90.0	89.9~65.0	64.9~35.0	34.9~20.0	19.9~0.0
0.6%	100.0~75.0	74.9~50.0	49.9~25.0	24.9~15.0	14.9~0.0
0.8%	100.0~55.0	54.9~35.0	34.9~15.0	14.9~5.0	4.9~0.0
1.0%	100.0~35.0	34.9~20.0	19.9~5.0	4.9~3.0	2.9~0.0

根据三叶草在不同盐浓度下得分的总和，可将种质材料的耐盐性分为 5 级：

- 1 强（总得分在 5~8 分范围内）
- 2 较强（总得分在 9~12 分范围内）
- 3 中等（总得分在 13~16 分范围内）
- 4 弱（总得分在 17~20 分范围内）
- 5 最弱（总得分在 21~25 分范围内）

如采用其他方法，请标明方法及方法来源

7.4 耐热性（参考方法）

目测法

在自然条件下最炎热的季节之后调查植株越夏存活率。实验小区面积至少 20m²，并记载小区栽培管理状况。用目测法调查植株越夏存活率，每个观察材料设 3 次重复（3 个小区），采用 5 点取样法，最炎热季节来临前，每点随机取 20~30 株，炎热季节过后，统计植株的越夏率成活率，计算植株越夏率。根据越夏率，将植株的耐热性分为 5 级，分级标准如下：

- 1 强（越夏存活率大于 91%）
- 2 较强（越夏存活率在 76%~90%）
- 3 中等（越夏存活率 51%~75%）
- 4 弱（越夏存活率 30%~50%）

5 最弱（越夏存活率小于 30%）

盆栽法

采用苗期盆栽耐热性鉴定。将种子播在装有草炭和蛭石（3：1）的育苗盘内，育苗盘大小约为 32 cm×45 cm×15cm，每份种质材料设 3 次重复，每个重复 20~30 株苗，株距 2.5cm，行距 6cm。置于人工气候室内育苗。出苗前温度 25℃，出苗后温度白天为 25~28℃，晚间 15~20℃，每天光照 16h，定期浇水。幼苗生长到 3~4 叶期时，进行高温处理，温度设为 35℃~40℃，处理到部分鉴定材料出现整株叶片呈现萎蔫枯死时停止处理，处理期间正常浇水。热胁迫结束后，调查幼苗的热害症状，根据热害症状，将鉴定种质材料的抗热性分为 5 级：

- 1 强（无热害症状或 10%以下的叶变黄）
- 2 较强（热害症状不明显，10%~30%的叶片变黄）
- 3 中等（热害症状较为明显，30%~60%的叶片变黄）
- 4 弱（热害症状极为明显，60%以上叶片变黄，少数叶片萎蔫枯死）
- 5 最弱（热害症状极为严重，整株叶片萎蔫枯死）

如采用其他方法，请标明方法及方法来源

8 抗病虫害（参考方法）

8.1 锈病抗性

三叶草对锈病的抗性采用苗期人工接种鉴定法。

①鉴定材料准备

②播种育苗

播种基质为经高压灭菌的土壤、草炭和蛭石的混合物，比例为 1：1：1。供试品种种子经 0.1%升汞溶液消毒 3~5min 后，用清水冲洗干净，放入垫有滤纸的培养皿中，然后置于 20℃的培养箱中发芽，待胚根长到 0.5cm 时，将其播于装有混合物的塑料育苗钵内，每钵 5 粒，每品种重复 3 次，每重复 30~40 株苗。在 22~25℃温室内育苗。

③接种液的制备

从发生锈病的不同地区采集夏孢子，以确保所接种的菌原具有代表性。或从已被接种了代表性病原物并保存在室温的感病品种上采集夏孢子。为了保证所

接种的病原菌具有较高的萌发率，使用新鲜采集的夏孢子。将采集的夏孢子用蒸馏水配成孢子悬浮液，在悬浮液中加入吐温 20（每 100ml 加入 2 滴吐温 20），然后将孢子悬浮液搅拌至少 20 分钟，以使夏孢子在溶液里充分散布均匀。再用血球计数板测数和调节孢子浓度至 3.5×10^5 个夏孢子/ml。

④接种方法

选择生长 3~5 周幼苗接种，采用喷雾接种法。用小型手持喷雾器将上述接种液均匀地喷于植物叶片上至叶面上的夏孢子悬浮液开始下滴。将接种后的植株置于 25℃ 和相对湿度为 100% 的黑暗条件下保湿 24h。以使夏孢子能在适宜的条件下萌发和侵入。经过保湿处理后的植株再移至 25℃，每天日照 16h 的温室或人工气候室中管理。

⑤病情调查标准与分级标准

于接种后的 15~20d 调查发病情况。记录病株数及病级。选取每株上发病最严重的小叶进行病级的评价，病害的分级标准如下：

病级 病 情

0 级 无病症

1 级 植株上有极少的病斑，但未出现破裂的夏孢子堆

2 级 植株上有较少的病斑，并出现个别破裂的夏孢子堆

3 级 植株上有明显的病斑，未破裂的疱疹及一些破裂的小夏孢子堆

4 级 植株上有许多破裂的小夏孢子堆及少量较大破裂的夏孢子堆

5 级 植株上有许多中等至较大的已破裂的夏孢子堆

计算病情指数，公式为：

$$DI = \frac{\sum (n_i \times S_i)}{5N} \times 100$$

式中：DI--病情指数

S--发病级别

n--相应发病级别的株数

i--病情分级的各个级别

N--调查总株数

种质材料对锈病的抗性根据苗期病情指数分为 5 级：

- | | | |
|---|---------|-----------------------|
| 1 | 高抗 (HR) | ($DI \leq 10$) |
| 3 | 抗病 (R) | ($10 < DI \leq 20$) |
| 5 | 中抗 (MR) | ($20 < DI \leq 30$) |
| 7 | 感病 (S) | ($30 < DI \leq 50$) |
| 9 | 高感 (HS) | ($DI > 50$) |

8.2 霜霉病抗性

三叶草对霜霉病的抗性采用苗期人工接种鉴定法。

① 鉴定材料准备

② 播种育苗

播种基质为经高压灭菌的土壤、草炭和蛭石的混合物，比例为 1: 1: 1。供试品种种子经 0.1% 升汞溶液消毒 3~5min 后，用清水冲洗干净，放入垫有滤纸的培养皿中，然后置于 20℃ 的培养箱中发芽，待胚根长到 0.5cm 时，将其播于装有混合物的塑料育苗钵内，每钵 5 粒，每品种重复 3 次，每重复 40~50 株苗。在 22~25℃ 温室内育苗。

③ 接种液的制备

从不同的发病区采集病叶，以获得具有代表性的接种体。将采回的病叶先在 20℃ 和相对湿度为 100% 的黑暗条件下保湿 16h，诱使病叶上产生更多的孢子囊。或从已被接种了代表性病原物并保存在室温的感病品种上采集孢子囊，且为了诱使病叶上产生更多的孢子囊，在采集孢子囊之前，同样需要将病株置于 20℃ 左右和相对湿度为 100% 的黑暗条件下保湿处理 16h。将经过保湿处理的病叶立即放入内有适量蒸馏水的三角瓶或者广口瓶等内，封好口或盖，用力振荡瓶子，以将病叶上的孢子囊充分洗下来。在用血球计数板测数和调节孢子囊浓度至每毫升含至少 25000 个有活力的孢子囊。孢子囊悬浮液配好后应立即使用。

附：孢子囊活力的测定方法：将孢子囊悬液滴于一干净的载玻片上，放入一个下面垫有一层用蒸馏水浸润的滤纸的培养皿内，盖上培养皿盖，在 20℃ 下黑暗培养 24h，然后在显微镜下观察统计产生芽管（即有活力）的孢子囊的百分率。再用此数据校正接种用孢子囊悬浮液的浓度。

④ 接种方法

于子叶展平期接种，采用点滴接种法。用吸管吸取上述接种液，滴于幼苗的

子叶中央，形成小液滴。接种后将植株放在相对湿度为 100%、20℃的温室中黑暗保湿 24h，后将植株置于 20℃，每天日照 16h 的温室或人工气候室中管理。

⑤病情调查标准与分级标准

于接种后的 10~13d 调查发病情况。记录病株数及病级。病级分级标准如下：

病级 病 情

0 级 无病症

1 级 叶片出现小的病斑，坏死斑面积占叶面积的 10%以下

2 级 感病叶片坏死斑面积约占叶片面积的 10%-25%

3 级 感病叶片坏死斑面积约占叶片面积的 25%-40%

4 级 感病叶片坏死斑面积约占叶片面积的 50%-90%，病菌侵染全株

5 级 叶片几乎全部枯死，植株开始出现死亡

计算病情指数，公式为：

$$DI = \frac{\sum (n_i \times S_i)}{5N} \times 100$$

式中：DI--病情指数

S--发病级别

n--相应发病级别的株数

i--病情分级的各个级别

N--调查总株数

种质材料对霜霉病的抗性根据苗期病情指数分为 5 级：

- | | | |
|---|---------|----------------|
| 1 | 高抗 (HR) | (DI ≤ 5) |
| 3 | 抗病 (R) | (5 < DI ≤ 10) |
| 5 | 中抗 (MR) | (10 < DI ≤ 15) |
| 7 | 感病 (S) | (15 < DI ≤ 20) |
| 9 | 高感 (HS) | (DI > 20) |

8.3 菌核病抗性

三叶草对菌核病的抗性采用苗期人工接种鉴定法。

①鉴定材料准备

②播种育苗

播种基质为经高压灭菌的土壤、草炭和蛭石的混合物，比例为 1: 1: 1，并用石灰将 pH 值调到 7。供试品种种子经 0.1% 升汞溶液消毒 3~5min 后，用清水冲洗干净，放入垫有滤纸的培养皿中，然后置于 20℃ 的培养箱中发芽，待胚根长到 0.5cm 时，将其播于装有混合物的塑料育苗钵内，每钵 5 粒，每品种重复 4 次，每重复 25 株苗。在 20~25℃ 温室内育苗。

③接种液的制备

以菌丝体片段悬浮液为接种体。

从病株上采集菌核，0.1% 升汞对菌核进行表面消毒，再用无菌水冲洗 4 次，用小刀将菌核切成 2mm 的小块，置于 PDA 或 V-8 碳酸钙琼脂平板培养基上，在 15℃ 条件下培养，获得纯菌落。也可感病植株的病组织上分离得到纯的病原菌落。用直径 0.5cm 的打孔器取生长活跃的菌落边缘的菌丝块，移入 PDA 平板培养基上活化，取活化后生长到直径为 3cm 的菌落 3 个（连同琼脂培养基一起），放入 250ml 蒸馏水中，用韦氏捣碎机处理 2~3s，过滤去渣后得到菌丝体片段悬浮液。每盆接种悬浮液 2.5ml。

也可采用 PD（马铃薯葡萄糖）液体培养基振荡培养获得接种体。即在无菌条件下沿上述经活化的菌落生长活跃的边缘切取直径为 0.5~0.7 mm 的菌片，接种于 200ml 灭菌的 PD 液体培养基内，15℃ 条件下振荡培养 7d，过滤得到菌丝体后，放入 250ml 蒸馏水中，其后操作方法同上。

④接种方法

选择生长 2 周幼苗接种，采用喷雾接种法。用小型手持喷雾器将过滤后的悬浮液均匀地喷于植物叶片上。接种后将植株放在 15℃ 的生长箱中培养，或放在 15℃ 温室中并用透明的塑料薄膜覆盖育苗盘 7~10d。

⑤病情调查标准与分级标准

于接种后的 21d 调查发病情况。记录病株数及病级。病级的分级标准如下：

病级	病 情
----	-----

- 0级 无病症
- 1级 植株叶片上仅出现 1-2 个小的感病病斑
- 2级 感病叶片明显增多，植株受到轻微损伤，但无死叶出现
- 3 顶部的叶片死去，茎中部及基部的叶片仍然保持绿色
- 级 茎顶部、中部的叶片死去，仅基部的个别叶片仍带有绿色，植株受
- 4级 到严重损伤
- 叶全部枯死，植株上部大都腐烂或变色，植株开始出现死亡
- 5级

计算病情指数，公式为：

$$DI = \frac{\sum (n_i \times S_i)}{5N} \times 100$$

式中：DI--病情指数

S--发病级别

n--相应发病级别的株数

i--病情分级的各个级别

N--调查总株数

种质对菌核病的抗性根据苗期病情指数分为 5 级：

- | | | |
|---|---------|----------------|
| 1 | 高抗 (HR) | (DI ≤ 10) |
| 3 | 抗病 (R) | (10 < DI ≤ 30) |
| 5 | 中抗 (MR) | (30 < DI ≤ 50) |
| 7 | 感病 (S) | (50 < DI ≤ 70) |
| 9 | 高感 (HS) | (DI > 70) |

8.4 白粉病抗性

三叶草对白粉病的抗性鉴定采用苗期人工接种鉴定法。

①鉴定材料的准备

②播种育苗

播种基质为经高压灭菌的土壤、草炭和蛭石的混合物，比例为 1: 1: 1。供试品种种子经 0.1% 升汞溶液消毒 3~5min 后，用清水冲洗干净，放入垫有滤纸的培养皿中，然后置于 20℃ 的培养箱中发芽，待胚根长到 0.5cm 时，将其播于装有混合物的育苗盘内，每个品种重复 3 次，每个重复 40~50 株苗。22~25℃ 温

室内育苗。

③接种液的制备

从田间自然发病的植株上采集分生孢子。用毛笔刷取叶片上长出的新鲜孢子，然后放入盛有无菌水的烧杯中，再滴加 Tween-20（每 1000 毫升加入 2 滴 Tween-20），搅拌均匀即得孢子悬浮液。用血球计数板测数和调节孢子浓度至 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 个分生孢子/ml。

④接种方法

选择生长 3~5 周幼苗接种。采用喷雾接种法。用小型手持喷雾器将上述接种液均匀地喷于植物叶片上（叶面上不要有水滴）。接种后于 22~25℃ 的温室内黑暗保湿 16 h。后转入白天 25~28℃，夜晚 18℃ 左右的温室内正常管理。

也可直接用分生孢子喷粉接种：将采集到的新鲜分生孢子与滑石粉按 1: 10 的比例混合，然后用小型喷粉器将混合物均匀喷撒在潮湿的植物叶片上。其后操作方法同上。

⑤病情调查与分级标准

接种后 10 d 调查发病情况。记录病株数及病级。病级的分级标准如下：

病 级	病 情
0 级	无病症
1 级	仅在叶面 1/3 以下的小范围内产生有限的菌丝体，白粉不明显
2 级	可在叶面 1/3~2/3 的范围内产生中量菌丝体和少量分生孢子，白粉层较明显
3 级	叶面 2/3 以上的范围内产生较大量的菌丝体和分生孢子，白粉层明显，连片
4 级	病症似上，白粉层更为浓厚，叶片表现褪绿，坏死
5 级	病症似上，叶片褪绿和坏死的面积占整个叶面积的 2/3 以上

计算病情指数，公式为：

$$DI = \frac{\sum (n_i \times S_i)}{5N} \times 100$$

式中：DI--病情指数

S--发病级别

n-- 相应发病级别的株数

i-- 病情分级的各个级别

N--调查总株数

种质对白粉病的抗性依苗期病情指数分 5 级。

1	高抗 (HR)	(DI ≤ 25)
3	抗病 (R)	(25 < DI ≤ 45)
5	中抗 (MR)	(45 < DI ≤ 65)
7	感病 (S)	(65 < DI ≤ 80)
9	高感 (HS)	(DI > 80)

8.5 炭疽病抗性

三叶草对炭疽病的抗性鉴定采用苗期人工接种鉴定法。

① 鉴定材料的准备

② 播种育苗

播种基质为经高压灭菌的土壤、草炭和蛭石的混合物，比例为 1: 1: 1。供试品种种子经 0.1% 升汞溶液消毒 3~5min 后，用清水冲洗干净，放入垫有滤纸的培养皿中，然后置于 20℃ 的培养箱中发芽，待胚根长到 0.5cm 时，将其播于装有混合物的育苗盘内，每个品种重复 14 次，每个重复 50 株苗。温度保持在 23℃ 之间，每天日照 16h 以上。控制病虫害，并提供可促进植株生长健壮的条件。

③ 接种液的制备

采集感病组织，在 PDA 或燕麦片琼脂培养基上分离和培养病原菌，培养温度为 23℃，培养 7d 后，用灭菌的蒸馏水洗下培养物上分生孢子，用血球计数板测数和调节分生孢子浓度至约 2×10^6 个分生孢子/ml，再按每 1000ml 孢子悬浮液中 2 滴的量加入吐温 20。

④ 接种方法

取生长 7~14d 的幼苗接种。接种采用喷雾接种法。用小型手持喷雾器将上述接种液均匀地喷于植物叶片上。接种后于 23℃ 的条件下黑暗保湿（相对湿度为 100%）48h。后转入 23℃ 的温室内正常管理。

⑤ 病情调查标准与分级标准

接种后 10~14d 调查发病情况，记录发病植株的数量。抗性分级标准如下：

1	高抗 (HR)	(感病的植株不到 10%)
3	抗病 (R)	(感病的植株达 10%~20%)
5	中抗 (MR)	(感病的植株达 20%~35%)
7	感病 (S)	(感病的植株达 35%~50%)

9 高感 (HS) (感病的植株达到 50% 以上)

8.6 根结线虫抗性

三叶草对根结线虫的接种采用苗期人工接种鉴定法。

① 鉴定材料的准备

② 播种育苗

播种基质为沙壤土，需在 121℃ 蒸汽下灭菌 2h。供试品种种子划破种皮并经 0.1% 升汞溶液消毒 3min 后，用清水冲洗干净，播于装有沙壤土的种植盘中（足够深便于根系的正常生长），株行距为 1.5×3cm，每品种重复 4 次，每重复 100 株苗。接种根瘤菌，并施足量的肥。放在 25~30℃ 温室内育苗。

③ 接种体来源及制备

从温室培养的植株上采用 NaOCl 方法 (Nelson 等 1985) 获得虫卵，然后将虫卵保存在灭菌水或去离子水中，放置在 0~5℃ 的冰柜中，最长时间不超过 1 周。接种时将虫卵制成孢子悬浮液，接种浓度为 100 个虫卵/ml。

④ 接种方法

当植株生长 4 周后进行接种。将虫卵悬浮液涂抹在暴露的根系上，每株接种悬浮液 5ml (虫卵为 500 个)，置于温室内培养。

⑤ (病情调查标准与分级标准

接种 8 周后，调查根结或卵块数。病情分级标准如下：

病级	病 情
0 级	无根结
1 级	1~2 个根结和卵块
2 级	3~10 个根结和卵块
3 级	11~30 个根结和卵块
4 级	31~100 个根结和卵块
5 级	100 个以上根结和卵块

病情指数计算公式为：

$$DI = \frac{\sum (n_i \times S_i)}{5N} \times 100$$

式中：DI--病情指数

S--发病级别

n--相应发病级别的株数

i-- 病情分级的各个级别

N--调查总株数

种质对根结线虫的抗性根据苗期病情指数分为 5 级：

1	高抗 (HR)	$(0 < DI \leq 1.0)$
3	抗 (R)	$(1.0 < DI \leq 2.0)$
5	中抗 (MR)	$(2.0 < DI \leq 3.0)$
7	低抗 (S)	$(3.0 < DI \leq 4.0)$
9	不抗 (HS)	$(DI > 4.0)$

8.7 蓝绿蚜虫抗性

三叶草对蓝绿蚜虫的抗性采用苗期人工接种鉴定法。

①鉴定材料的准备

②幼苗的培育

播种基质为混合土壤，即 8%沙土，3%泥炭，3%珍珠岩，1.4%熟石灰。供试品种种子经 0.1%升汞溶液消毒 3~5min 后，用清水冲洗干净，将其播于装有混合土的播种盘中（6×31×55cm）内，播深 1cm，用蛭石覆盖。每品种重复 3 次，每行种 50~70 株苗，间距为 3cm。放在 22±4℃温室内，每天 16h 的光照。

③接种体（虫源）准备

每年从蓝绿蚜虫的发病区收集虫源，在温室条件下，将苜蓿蚜接种在易受感染的植物上，温度控制在 22±4℃温室内，每天至少 16h 的光照。

④接种程序及方法

当种子萌发后，在子叶阶段，统计播种盘内苗数后，将蚜虫撒在植株上，每株至少接种 2 头蚜虫。温度控制在 18~26℃。接种 21d 后喷洒马拉松等杀虫剂，喷药后 7~10d 进行抗虫性的评价鉴定。

⑤抗虫性评价

一般将三叶草抗蓝绿蚜虫的危害分为 5 级。

- 1 高抗 (HR) (植株生长正常，形成正常的叶片)
- 3 抗 (R) (植株生长正常，叶片较小)
- 5 中抗 (MR) (比正常的植株矮些，叶片皱缩)
- 7 低抗 (S) (植株矮小，叶片皱缩，通常萎蔫枯黄)

9 不抗 (HS) (部分或大部分植株出现死亡)

9 其他特征特性

9.1 种质用途

三叶草种质资源具有广泛的用途,一种种质可以有多种用途,主要用途为以下6类。

- 1 饲用 (家畜或野生动物的饲草料)
- 2 生态 (用于水土保持,防风固沙,草地植被恢复等)
- 3 药用 (草药或制药的原材料)
- 4 纤维 (可用作纤维植物)
- 5 观赏 (庭院、运动场绿化)
- 6 蜜源 (可用作蜜源植物)

9.2 授粉方式

- 1 自花授粉 (自然异交率为1%~4%)
- 2 异花授粉 (自然异交率可达95%以上,甚至100%)

9.3 染色体倍数

三叶草细胞染色体镜检是鉴别三叶草种质资源染色体倍性的主要方法,在染色体镜检中,多采用挤压法,所用染色剂多为醋酸系列染色剂;样品选取,一般选择细胞分裂旺盛、组织幼嫩的部位,例如,根尖和胚根、幼叶等。

根尖和幼叶的染色体镜检步骤如下:

待三叶草种子萌发幼根长至1 cm左右时,从其尖端取一段作为样品。在醋酸乙醇固定剂中固定半小时以上,移入软化剂(错酸、盐酸、硫酸软化剂)中软化3~5 min (见样品由白色变为半透明为止),将样品自软化剂中取出,放到载玻片上,加上盖玻片,并在盖玻片上加压,将样品压薄,再用针尖将盖玻片挑开一个缝隙,用滴管沿缝隙加一滴染色剂(1% 醋酸地衣红或1% 醋酸酚蓝),染色3 min后将针取去,挤去多余的染色剂,进行镜检,挑选处于四分体阶段的小孢子母细胞进行染色体记数,即可确定该样品染色体倍性。

9.4 核型

采用细胞遗传学方法对染色体的数目、大小、形态和结构进行鉴定。以核型

公式表示，如， $2n=4X=32$ 。

9.5 指纹图谱与分子标记

对进行过指纹图谱分析或重要形状分子标记的三叶草种质，记录指纹图谱或分子标记的方法，并注明所用引物、特征带的分子大小或序列以及标记的性状和连锁距离。

9.6 备注

三叶草种质特殊描述符或特殊代码的具体说明。

