

· 种子检验 ·

# 四唑染色法测定唐古特大黄种子生活力的研究

谢小龙<sup>1,2</sup>, 熊辉岩<sup>3</sup>, 王莉<sup>2</sup>, 胡延萍<sup>2</sup>, 杨建<sup>2</sup>

(1. 河南中医学院药学院, 郑州 450046; 2. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008;

3. 青海大学农牧学院, 西宁 810016)

## Study on Tetrazolium Method for Testing Seed Viability of *Rheum tanguticum*

XIE Xiao-long<sup>1,2</sup>, XIONG Hui-yan<sup>3</sup>, WANG Li<sup>2</sup>, HU Yan-ping<sup>2</sup>, YANG Jian<sup>2</sup>

**摘要:**采用随机区组试验,研究四唑(2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride,缩写为TTC)染色法测定唐古特大黄种子生活力的方法。结果表明,TTC溶液浓度和染色时间对唐古特大黄种子胚的染色效果均具有显著影响,在30℃黑暗条件下,以0.20%TTC溶液染色3h为生活力测定的最佳条件;同时,建立了四唑染色法测定唐古特大黄种子生活力的鉴定标准。

**关键词:** 唐古特大黄; 种子生活力; 四唑测定

**中图分类号:** R 282.71 **文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-4705(2013)05-0117-03

唐古特大黄(*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf.)为蓼科(Polygonaceae)多年生草本植物<sup>[1]</sup>,其干燥根和根茎为大黄药材的主要来源之一,具有泻下攻积,清热泻火,凉血解毒,逐瘀通经,利湿退黄等功效<sup>[2]</sup>。随着野生资源的锐减,人工栽培成为缓解野生大黄生存压力和提供商品大黄的重要途径<sup>[3]</sup>。在农业生产实践中,大黄主要以种子(植物学中称为“瘦果”)进行繁殖<sup>[4]</sup>。种子质量直接影响药材产量和品质,因而种子检验至关重要。

生活力是指种子发芽的潜在能力或种胚所具有的生命力,是种子质量检验的一项重要内容,其测定方法包括四唑染色法、红墨水染色法、溴麝香草酚蓝法、农家简易法等多种,其中以四唑染色法应用最广,被列入国际种子检验规程和我国农作物种子检验规程<sup>[5-8]</sup>。本文旨在研究四唑(TTC)染色法测定唐古特大黄种子生活力的方法及其鉴定标准,为制定唐古特大黄种子检验规程提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验用唐古特大黄种子均采自青海省(表1),经

自然风干和净种后,装入纸袋于室内自然条件下保存。

表1 唐古特大黄种子样品

序号	采样地点	采样时间(年)
1	青海省果洛州班玛县达卡乡	2007
2	青海省果洛州班玛县知钦乡	2006
3	青海省果洛州玛沁县当洛乡	2006
4	青海省果洛州达日县建设乡	2006
5	青海省海南州泽库县宁秀乡	2006

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 TTC最佳染色条件

以1号唐古特大黄种子为材料,采用二因素随机区组试验,筛选最佳的TTC浓度和染色时间。TTC溶液以磷酸缓冲液配制<sup>[8]</sup>,设置浓度为0.15%,0.20%,0.25%,0.30%4个水平;染色时间设置1、2、3、4、5h5个水平。每处理重复3次,每重复30粒(60个半粒)种子。

唐古特大黄种子在20℃水中浸渍30h(15h时换1次水)后,沿其中一翅纵切,将其置于具盖培养皿中,加入TTC溶液浸没种子,于30℃黑暗条件下染色。染色结束后,取出种子并用自来水冲洗,观察、记录胚完全染为鲜红色的种子数目。

统计各处理中胚完全染色种子的百分率,采用SPSS 11.0统计软件进行方差分析,Duncan法进行多重比较<sup>[9]</sup>。

#### 1.2.2 生活力鉴定标准

对照2~5号唐古特大黄种子样品的发芽率和TTC染色情况,拟定出唐古特大黄种子生活力鉴定标准。

(1)发芽试验:唐古特大黄种子在纸间发芽床和

收稿日期:2013-01-27

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(编号:2007BAD64B04);“十二五”国家科技支撑计划项目(编号:2011BAI06B02);河南中医学院“博士科研基金”项目(编号:BSJJ2009-30)。

作者简介:谢小龙(1976-),男,河南武陟人;博士,讲师,主要从事药用植物资源相关研究;E-mail: xiaolongxie@126.com。

15/25 °C 变温的条件下培养, 变温采用 25 °C 光照培养 16 h 和 15 °C 黑暗培养 8 h 的变化周期, 培养期间始终保持发芽床湿润。以形成正常幼苗为发芽标准, 每天记录种子发芽数, 至无正常幼苗形成时结束<sup>[8]</sup>, 计算种子发芽率。每份实验样品重复 3 次, 每重复 50 粒种子。

(2) 种子四唑染色情况: 按照 1.2.1

中四唑染色方法, 将唐古特大黄种子于 0.20% TTC 溶液中染色 3 h。每份实验样品重复 3 次, 每重复 30 粒 (60 个半粒) 种子。染色完毕后, 按不同标准统计有生活力种子 (表 5 和表 6)。

SPSS 11.0 统计软件对发芽率和生活力进行相关分析<sup>[9]</sup>, 以二者的相关性来确定生活力鉴定标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 TTC 最佳染色条件的确定

TTC 溶液浓度对唐古特大黄种子胚的染色效果有显著影响 ( $p < 0.05$ ) (表 2)。TTC 为 0.25% 时, 胚完全染色种子的百分率最大 (60.8%); TTC 为 0.20% 时, 染色效果与其无显著差异; 而 TTC 为 0.15% 和 0.30% 时, 胚完全染色种子的百分率较 0.25% 时显著降低。因而, TTC 溶液最佳的染色浓度为 0.20% 与 0.25% (表 3)。

表 3 TTC 溶液浓度对唐古特大黄种子染色效果的影响

TTC 浓度 (%)	胚完全染色种子的百分率 (%)	差异显著性	
		0.05	0.01
0.15	56.1	b	AB
0.20	57.6	ab	AB
0.25	60.8	a	A
0.30	54.7	b	B

表 4 染色时间对唐古特大黄种子染色效果的影响

染色时间 (h)	胚完全染色种子的百分率 (%)	差异显著性	
		0.05	0.01
1	16.5	b	B
2	67.1	a	A
3	67.6	a	A
4	67.6	a	A
5	67.5	a	A

染色时间对唐古特大黄种子胚的染色效果有极显著影响 ( $p < 0.01$ ) (表 2)。染色 1 h 时, 胚完全染色种子的百分率最低 (16.5%); 染色至 2 h 时, 胚完全染色种子的百分率极显著高于 1 h, 但继续延长染色时间, 对染色效果无显著影响 (表 4)。考虑到缩短染色周期以及种子条件差异对染色时间的不同要求<sup>[10]</sup>, 选择 3 h 为最佳染色时间。

表 2 TTC 溶液浓度和染色时间对唐古特大黄种子染色效果的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
TTC 浓度	307.953	3	102.531	4.284	0.010
染色时间	24910.926	4	6227.731	260.191	0.000
TTC 浓度 × 染色时间	340.556	12	28.380	1.186	0.326
误差	957.407	40	23.935		
总变异	26516.482	59			

本试验中, TTC 溶液浓度和染色时间互作对唐古特大黄种子胚的染色效果并无显著影响 (表 2)。因而, 最佳 TTC 溶液浓度和最佳染色时间的任意组合均可作为最优组合。结合试验原始数据, 选定 0.20% TTC 溶液中染色 3 h 为佳。

### 2.2 生活力鉴定标准的建立

TTC 染色时, 唐古特大黄种子的胚乳并不被染色, 因而使用该法测定唐古特大黄种子生活力时, 无需考虑其胚乳是否着色。

表 5 和表 6 表明, 仅以胚完全染色时作为有生活力种子或者以胚完全染色以及子叶顶端  $\leq 1/3$  不染色而其他部位均染色的种子作为有生活力种子时, 生活力和发芽率显著相关 ( $p < 0.05$ ), 而以其他鉴定标准测定的生活力均与发芽率无显著相关性 ( $p > 0.05$ )。鉴于子叶顶端  $\leq 1/3$  不染色而其他部位均染色的种子计为有生活力种子时, 发芽率和生活力在数值上更为接近, 因而采用胚完全染色和仅子叶顶端  $\leq 1/3$  不染色的种子作为有生活力种子的标准。

表 5 唐古特大黄种子的胚染色情况

序号	胚四唑染色状态
A	完全染色
B	子叶顶端 $\leq 1/3$ 不染色, 其余完全染色
C	子叶顶端 $1/3 \sim 1/2$ 不染色, 其余完全染色
D	子叶不染色, 其余完全染色
E	胚根不染色, 其余完全染色
F	完全不染色
G	胚乳及胚腐烂

据此, 拟定唐古特大黄种子 TTC 染色有生活力的鉴定标准。有生活力的种子染成有光泽的鲜红色, 且染色均匀。符合下列任意一条的列为有生活力种子一类: 胚切面完全染色; 子叶顶端  $\leq 1/3$  面积不染色, 其余部分完全染色。

凡不符合上述标准的均为无生活力的种子。具体包括: 胚乳及胚腐烂; 完全不染色; 胚根不染色; 子叶顶端  $> 1/3$  面积不染色。

(下转第 122 页)

子发芽率<sup>[6]</sup>,但 HgCl<sub>2</sub> 不影响烟草等种子的发芽<sup>[7,8]</sup>。而酒精浸泡既可达到消毒效果,也可促进许多种子的发芽<sup>[8,9]</sup>。本课题组试验结果表明,0.1% HgCl<sub>2</sub> 对穿心莲种子的消毒效果显著,但会降低种子发芽率,不宜用于穿心莲种子的消毒。而50%~75%酒精浸种,不仅与文献报道一致,可促进种子发芽,同时对穿心莲种子的消毒效果也极其显著。由些可知,适当浓度的酒精可用于穿心莲种子的消毒。

#### 4 结论

浸种可显著提高穿心莲种子的发芽率,最佳浸种时间为2 h。穿心莲种子细小,不宜进行机械摩擦处理。种子最适发芽温度为25~30℃,最低发芽临界温度为15℃。穿心莲种子为非需光型种子,但光照可显著促进种子发芽。酒精和 HgCl<sub>2</sub> 浸种处理均能起到消毒的作用,但 HgCl<sub>2</sub> 对种子的发芽有显著抑制作用,而酒精则可促进种子的发芽;用酒精消毒,酒精最佳浓度为50%、消毒最佳时间为30 min。

(上接第118页)

表6 不同鉴定标准下生活力与发芽率的相关分析

序号	有生活力种子的标准	生活力与发芽率相关系数	显著性
1	A	0.965	0.035
2	A+B	0.959	0.041
3	A+B+C	0.927	0.073
4	A+B+C+D	0.949	0.051
5	A+B+C+E	0.938	0.062
6	A+B+C+D+E	0.912	0.088

注:A~E各字母含义见表5。

#### 3 讨论

发芽研究表明,在1.2.2适宜发芽条件下,唐古特大黄种子完成发芽需时22 d(实验数据另文发表),而采用TTC染色法测定一批种子生活力全程则仅需35 h;同时,试验所测定的生活力和其发芽率之间具有显著的相关性。因而,当生产中急需了解某批种子的质量情况时,可以通过生活力测定结果快速地估测种子发芽率。但生活力和发芽率之间的回归关系,仍需加大样本量后进行研究。

本实验表明,TTC染色法测定唐古特大黄种子生活力时,其胚乳并不着色,因而进行生活力测定时只需对其胚的染色情况进行鉴定。

#### 参考文献:

- [1] GB/T 3543.4. 农作物种子检验规程 发芽试验.
- [2] 李玲梅,李明. 不同处理方法对穿心莲种子萌发影响的初步研究[J]. 广东药学院学报,2011,27(4):371-374.
- [3] 邱道寿,王泽清,白春华,等. 优质穿心莲 GAP 种植技术[J]. 广东农业科学,2008(增刊):102-105.
- [4] 朱玉宝. 药用植物穿心莲栽培技术[J]. 中国林副特产,2012(3):60-61.
- [5] 童家赞,张晓,何瑞,等. 穿心莲种子发芽试验标准化研究[J]. 种子,2011,30(2):1-3.
- [6] 张玉,李聪,白史且,等. 三种不同消毒剂对饲草菊苣种子萌发和生长的影响[J]. 草业学报,2010,19(1):253-257.
- [7] 彭木,张晓华,黄凤兰,等. 不同处理对蓖麻种子萌发的影响[J]. 黑龙江农业科学,2012(10):29-33.
- [8] 鲁黎明,安影. 不同消毒剂对烟草种子消毒效果及萌发的影响[J]. 种子,2012,31(4):93-95.
- [9] 尹明华,杨慧璐. 药用植物黄芪种子无菌体系的建立[J]. 广东农业科学,2010(8):45-46.
- [10] 栾博宇,王洪君,于洪柱,等. 紫花苜蓿无菌苗培养前的种子消毒技术研究[J]. 畜牧与饲料科学,2009,30(10):172-173.

#### 参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第25卷,第1分册)[M]. 北京:科学出版社,1998:184-186.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2010年版(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:22-23.
- [3] 李敏,李丽霞,刘渝,等. 大黄研究进展[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2006,8(4):34-39.
- [4] 尕玛旺扎. 玉树州唐古特大黄种植技术规范[J]. 青海农技推广,2009(1):42-43.
- [5] 沈宇峰,王志安,俞旭平,等. 白术种子生活力测定方法及其与发芽率的相关性研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(3):248-250.
- [6] 刘千,罗浩,蔡文国,等. 川牛膝种子发芽试验与生活力测定方法的研究[J]. 种子,2011,30(7):20-22,25.
- [7] 国家技术监督局. 农作物种子检验规程 GB/T 3543.1-3543.7-1995[S]. 北京:中国标准出版社,1995:65-73.
- [8] 国际种子检验协会(ISTA)编. 农业部全国农作物种子质量监督检测中心和浙江大学种子科学中心译. 1996国际种子检验规程[S]. 北京:中国农业出版社出版,1999.
- [9] 卢纹岱主编. SPSS for Windows 统计分析软件(第2版)[M]. 北京:电子工业出版社,2002.
- [10] 颜启传主编. 种子学[M]. 北京:中国农业出版社,2001:470-485.