

凌 敏,杨秀莲,王良桂. 四唑染色法测定巨紫荆种子生活力[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):295-297.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.098

# 四唑染色法测定巨紫荆种子生活力

凌 敏,杨秀莲,王良桂

(南京林业大学风景园林学院,江苏南京 210037)

**摘要:**为探讨巨紫荆(*Cercis gigantea*)种子生活力的适宜测定方法,采用四唑染色法,以染色浓度、染色温度、染色时间设计正交试验,研究巨紫荆种子的生活力测定条件。结果表明,染色浓度、染色温度、染色时间 3 者之间存在一定的关系,TTC 浓度为 0.1%、温度为 35℃、染色时间为 8 h 是巨紫荆种子生活力测定的最佳条件。

**关键词:**巨紫荆种子;四唑染色;生活力

**中图分类号:**S339.3<sup>+</sup>1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)01-0295-03

巨紫荆(*Cercis gigantea*)原产中国浙江、河南、湖北、广东、贵州等地,是现存极少的乡土树种。巨紫荆是高大落叶乔木,高达 15 m,胸径可达 40 cm。树干通直,生长整齐,枝展开张,树冠绿荫面积大,覆盖度高,园艺性状突出,适宜作行道树、庭荫树,艺术效果良好。巨紫荆春季满树开淡红或淡紫红花,先花后叶,灿若云锦,观赏效果极佳;夏季叶绿荚红,蒴质浓厚;秋季彩叶如霞;冬季落叶后荚果仍然悬挂枝头,尽展生命之劲力。巨紫荆实乃春季观花、夏秋观叶、冬季观果的优良园林树种,是园林绿化中具有广阔应用前景的乡土树种<sup>[1]</sup>。在小苗培育方面,巨紫荆的出苗率一直不高,播种前用浓硫酸酸蚀再用赤霉素浸泡,其发芽率最高仅有 25.5%<sup>[2]</sup>。准确的

生活力测定方法能够真实反映种子的发芽能力,尤其对一些休眠期长的种子更为适用。四唑(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride,TTC)测定技术是通过鉴定种子内部活组织的染色情况测定种子活力,是国际上公认的测定种子生活力较好的方法,能够快速、有效、准确地反映出种子的生活力,是《国际种子检验规程》中用于测定发芽缓慢或有休眠种子的生活力、快速判断种子潜在发芽能力的一种有效方法<sup>[3-5]</sup>。

本研究利用四唑染色法,设置不同的 TTC 浓度、染色温度和时间,研究巨紫荆种子生活力测定的适宜条件,探究巨紫荆种子生活力的快速测定方法,为客观评价巨紫荆的发芽能力,科学预测种子用量以及出苗率等提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

巨紫荆种子于 2013 年 11 月 12 日采自南京林业大学梁希广场前,种子的净度为 96.12%,千粒质量为 21.50g,含水量为 17.15%。

## 参考文献:

- [1]王智民,高慧敏,付雪涛,等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(23):1925-1928.
- [2]朱晶晶,王智民,匡艳辉,等. 一测多评法同步测定人参和三七药材中多种人参皂苷的含量[J]. 药学学报,2008,43(12):1211-1216.
- [3]匡艳辉,朱晶晶,王智民,等. 一测多评法测定黄连中小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱、药根碱含量[J]. 中国药理学杂志,2009,44(5):390-394.
- [4]朱晶晶,王智民,张启伟,等. 一测多评法同时测定黄芩药材中 4 种黄酮类成分的含量[J]. 中国中药杂志,2009,34(24):3229-3234.
- [5]王智民,钱忠直,张启伟,等. 一测多评法建立的技术指南[J]. 中国中药杂志,2011,36(6):656-658.
- [6]杨全军,范明松,孙兆林,等. 栀子化学成分、药理作用及体内过程研究进展[J]. 中国现代中药,2010,12(9):7-12.
- [7]孟祥乐,李红伟,李 颜,等. 栀子化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国新药杂志,2011,20(11):959-967.

收稿日期:2014-03-05

基金项目:江苏省林业三新工程项目(编号:lysx[2013]24)。

作者简介:凌 敏(1990—),女,安徽滁州人,硕士研究生,研究方向为园林植物与应用。E-mail:974574883@qq.com。

通信作者:王良桂,教授,博士生导师。E-mail:wlg@njfu.com.cn。

用;有文献报道,京尼平 1- $\beta$ -D 龙胆二糖苷能改善戊巴比妥钠引起的心力衰竭;绿原酸为栀子中主要有机酸酯类成分,具有显著的抗癌作用及保肝利胆作用;西红花苷-I、西红花苷-II 是西红花、栀子中共有的色素类成分,具有去黄疸、利胆及明显的降血脂作用<sup>[7]</sup>。本研究通过一测多评的分析方法对栀子药材中 6 种成分进行测定,为栀子药材中活性成分的多成分、多指标质量控制提供了新模式。

环烯醚萜类化合物是已知栀子药材中的有效成分,238 nm 为京尼平苷酸、栀子苷、京尼平 1- $\beta$ -D 龙胆二糖苷的最大吸收波长,330 nm 为酚酸类物质绿原酸常用检测波长,440 nm 为西红花苷类化合物西红花苷-I 和西红花苷-II 最佳检测波长,因此选用 238、330、440 nm 为检测上述 6 种成分的波长。

通过比较一测多评法和传统回归方程法所得栀子 6 种成分含量值,发现两者之间并没有显著差异,且不同实验室、仪器、色谱柱下各有效成分间的校正因子重现性良好,说明在对照品不足的情况下,将一测多评用于栀子中药材多指标质量评价与质量控制是可行的,该方法具有一定的发展前景。

1.2 TTC 染色法

1.2.1 正交试验 采用正交试验设计方法,确定巨紫荆种子生活力测定的适宜条件。选择 TTC 浓度、染色温度(烘箱温度)和时间等直接关系种子活力测定结果的 3 个因素,并设置 3 个不同的水平,进行正交试验(表 1)。

表 1 TTC 染色法测定因素与测定水平

水平	因素		
	A:TTC 浓度 (%)	B:染色温度 (℃)	C:染色时间 (h)
1	0.10	25	8
2	0.15	30	12
3	0.20	35	16

1.2.2 TTC 溶液配制 用超纯水分别将 TTC 配成 0.1%、0.15%、0.2% 浓度的溶液,pH 值范围为 6.8~7.2,保存于棕色瓶中。

1.2.3 浸泡处理 随机抽取 27 份巨紫荆种子,每份 50 粒,去子叶末端,放置于 27 个烧杯中,加入 25 mL 自来水中淹没种子,置于 25 ℃ 恒温培养箱中 24 h,待其吸水膨大后取出,用刀片及解剖针刺剥去种子的 3 层种皮,取出胚,供染色用。整个操作过程中,所有的种子都置于湿润的脱脂棉上,以保证种子的湿润。

1.2.4 染色 将准备好的每份 50 粒种胚分别放入 27 个小烧杯中,共 9 个处理,每个处理重复 3 次,加入对应的 TTC 溶液,分别放入 25、30、35 ℃ 的烘箱中避光染色。达到染色时间后,取出种胚,用清水冲洗,将种胚摆在滤纸上,根据种子染色的部位、染色面积的大小和染色程度,逐粒判断种子的生活力<sup>[6]</sup>。

1.3 TTC 浓度试验

在 35 ℃ 条件下,进行了不同浓度的 TTC 液(0.3%、0.4%、0.5%)对种子染色数目、染色时间及染色程度的比较试验。

1.4 种子发芽与生活力测定

根据不同的处理方法将随机抽取的巨紫荆种子分为 2 大组 10 小组。(1)98% 浓硫酸处理组:处理时间分别为 10 min(处理 1)、15 min(处理 2)、20 min(处理 3)、25 min(处理 4)、30 min(处理 5),处理对应时间后,再分别置于流水下冲洗 48 h。(2)热水浸泡 48 h 组:浸泡温度分别为 50 ℃(处理 6)、60 ℃(处理 7)、70 ℃(处理 8)、80 ℃(处理 9)、90 ℃(处理 10)。每组 3 个重复,每个重复 100 粒,处理完毕后进行发芽试验,将种子置于湿润的砂子中,25 ℃ 培养温度,每天光照 12 h,光照强度为 1600 lx,期间保持发芽盒内砂子湿润<sup>[7]</sup>。

2 结果与分析

2.1 TTC 浓度、染色温度和染色时间对种子生活力的影响

采用四唑染色法测定巨紫荆种子生活力的正交试验 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) 试验结果见表 2。巨紫荆种子生活力最高(99.33%)的处理组合为 0.15% TTC 浓度、35 ℃ 染色温度、8 h 染色时间(处理组合 6),以及 0.20% TTC 浓度、35 ℃ 染色温度、12 h 染色时间(处理组合 9);生活力最低(0.67%)的处理组合为 0.10% TTC 浓度、25 ℃ 染色温度、8 h 染色时间(处理组合 1),低于最高生活力 98.66%。

将所得数据进行方差分析,结果见表 3。染色温度以及染色时间的 *F* 值(53.72、20.78)均远大于 *F*<sub>0.01</sub>(3.92),表现差异极显著;TTC 浓度的 *F* 值(1.63)小于 *F*<sub>0.01</sub>,差异不显著。3 个因素对巨紫荆种子生活力的影响大小排序为温度>时间>TTC 浓度。

各因素不同水平的种子生活力平均值比较结果见表 4。随着 TTC 浓度升高,种子的活力呈现先上升后下降的趋势,但是其变化幅度不大,从节省原料的角度出发,可以考虑选择低浓度的 TTC;染色温度越高,巨紫荆种子的活力越高,当温度为 35 ℃ 时,巨紫荆种子的活力达到 98.66%,而且随着温度升高,差异显著,35 ℃ 条件下巨紫荆种子的活力比 30 ℃ 条件下提高了 38.88%;随着染色时间延长,种子活力也上升,表现差异显著,但相对于温度来说,其影响程度还是很小。综上所述,结合节约资源、减少污染的实际情况,TTC 法测定巨紫荆种子生活力的最佳条件为 0.10% TTC 浓度溶液,在 35 ℃ 烘箱中染色 8 h。

表 2 TTC 染色法正交试验结果

处理组合	因素			种子活力 (%)
	A	B	C	
1	1	1	1	0.67
2	1	2	2	61.33
3	1	3	3	97.33
4	2	1	2	2.00
5	2	2	3	97.33
6	2	3	1	99.33
7	3	1	3	64.67
8	3	2	1	20.67
9	3	3	2	99.33

表 3 TTC 浓度、温度、浸种时间处理的巨紫荆种子生活力测定方差分析

来源	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i> 值	<i>F</i> <sub>0.01</sub>
因素 A	2	198.74	99.37	1.63	3.92
因素 B	2	6536.97	3268.48	53.72	
因素 C	2	2528.07	1264.04	20.78	
误差	27	1642.54	60.84		

2.2 TTC 浓度与染色时间的关系

不同浓度 TTC 液(0.3%、0.4%、0.5%)对种子染色数目、染色时间及染色程度的比较试验结果见表 5。

表 4 不同水平的巨紫荆种子生活力平均值比较

水平	种子生活力平均值(%)		
	TTC 浓度	染色温度	染色时间
1	53.11c	22.45c	40.22c
2	66.22a	59.78b	54.22b
3	61.56b	98.66a	86.44a

注:同列中不同小写字母表示在 *P*<0.05 水平上表现差异显著。

表 5 不同浓度 TTC 液的染色情况

TTC 浓度 (%)	试验种子数 (粒)	染色种子数 (粒)	着色稳定时间 (h)
0.3	50	49	6
0.4	50	50	4
0.5	50	49	4

结合 TTC 浓度试验结果,可以看出只要染色温度适宜,TTC 浓度对巨紫荆种子活力的影响不大,不论浓度高或低,均能染色;TTC 浓度高时,可以缩短染色时间。出于节约试剂、减小污染的目的,在试验时尽可能选择较低浓度染色。根据上述结果,TTC 法测定巨紫荆种子生活力的最佳条件与正交试验结果一致。

2.3 种子发芽率与种子生活力的关系

试验进行 30 d 后种子均未见萌发,继续观察 1 个月,仅有个别种子开始出现霉烂现象,但是仍然没有萌发迹象。此时每个处理随机抽取 50 粒种子,用四唑染色法测定其种子的生活力。由表 6 可知,绝大多数成熟的巨紫荆种子具有良好的生命活力;在进行发芽试验时,适当的处理方法对种子之间生活力影响不大。

表 6 巨紫荆种子生活力测定结果

处理	有生活力种子数(粒)	无生活力种子数(粒)	发芽种子数(粒)	发霉种子数(粒)
1	48	2	0	0
2	49	1	0	0
3	45	5	0	0
4	46	2	0	2
5	43	1	2	4
6	47	3	0	0
7	50	0	0	0
8	47	3	0	0
9	45	4	0	1
10	42	4	0	4

3 结论与讨论

种子生活力反映了种子的发芽潜在能力和种胚所具有的生命力,是判断种子质量的重要指标<sup>[8]</sup>。四唑染色法是国际公认较好的测定种子活力的方法,已广泛应用于农作物和蔬菜种子的活力测定。由于 TTC 浓度、染色温度以及染色时间等的不同都会影响种子的活力判断,因此针对不同植物种子需要确定不同的活力测定条件。对巨紫荆种子生活力进行测定前,对测定巨紫荆种子生活力的 TTC 浓度以及染色温度作了简单的对比,结果表明当 TTC 浓度低于 0.10%、染色温度高于 50 ℃时,巨紫荆种子不染色或者染色情况较差,故试验时将 TTC 浓度设置高于 0.10%,染色温度低于 50 ℃。

TTC 浓度、染色温度、染色时间均为影响巨紫荆种子生活力的重要因素,其中染色温度及时间对生活力的影响极显著,在生活力测定中存在一定的线性关系,可以通过改变 TTC 浓度、染色温度、染色时间其中的两者而达到改变第 3 条件的目的<sup>[9]</sup>。染色温度为生活力测定的最主要限制因子,控制好染

色温度对巨紫荆种子生活力的测定具有重要意义。

从节约成本减少污染角度出发,可以通过降低 TTC 浓度、提高染色温度达到良好的染色效果<sup>[10]</sup>。生产上可根据实际情况,选择适宜的染色浓度(0.1%~0.2%),在 35 ℃下染色 8 h 或者在较高浓度(0.3%~0.5%)下于 35 ℃染色 4~6 h。根据本试验研究结果,种子生活力的最佳测定条件为 0.1% TTC 浓度溶液、35 ℃染色温度、8 h 染色时间。

前人试验表明,TTC 染色法测定结果与标准发芽率一般很接近,是最有希望代替发芽试验的方法<sup>[11-13]</sup>。但本研究结果表明,巨紫荆种子生活力和其发芽试验结果相差很大,TTC 染色法还不能取代巨紫荆种子的发芽试验。这主要在于巨紫荆种子萌发还没有建立起标准的发芽方法,在后续的试验中将对巨紫荆种子萌发的相关生理特性进行深入研究,以提高其生活力测定结果判定的准确性,从而为估测巨紫荆种子发芽率提供一种准确、快速、简便和适用的新方法。

参考文献:

[1]范军科,孙士杰. 优美的园林观赏树种——巨紫荆[J]. 林业实用技术,2004(8):43.

[2]卢芳,周瑞玲,蔡枫. GA<sub>3</sub> 处理与层积时间对巨紫荆种子萌发的影响[J]. 安徽农业科学,2007,35(21):6419-6420.

[3]国际种子检验协会,农业部全国农作物种子质量监督检测中心,浙江大学种子科学中心. 1996 国际种子检验规程[M]. 北京:中国农业出版社出版,1999.

[4]GB 2930—1982 牧草种子检验规程[S]. 北京:国家标准总局,1982.

[5]陶嘉龄,郑光华. 种子活力[M]. 北京:科学出版社,1991:19.

[6]宋松泉,程红焱,龙春林,等. 种子生物学研究指南[M]. 北京:科学出版社,2005.

[7]刘雅帅. 山茱萸种子休眠机理研究[D]. 南京:南京林业大学,2008.

[8]石磊,徐广灿,杨红兵. 四唑染色法测定厚朴种子生活力的条件研究[J]. 安徽农业科学,2013,41(13):5706,5730.

[9]蔡春菊,彭镇华,高志民,等. 四唑染色法测定毛竹种子生活力的研究[J]. 世界竹藤通讯,2008,6(3):10-13.

[10]喻方圆,唐燕飞. 四唑染色法快速测定任豆种子生活力的研究[J]. 种子,2004,23(7):40-42.

[11]颜启传,黄亚军. 种子四唑测定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1992.

[12]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.

[13]李进华,袁军,汪利燕,等. 四唑染色法快速测定麻疯树种子生活力研究[J]. 林业实用技术,2010(3):9-10.