

李曼,王鑫源,邢冰,等. 不同类型牛膝种子质量分级标准研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(20):149-153.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.20.028

不同类型牛膝种子质量分级标准研究

李曼,王鑫源,邢冰,李询,杨朝帆,董诚明

(河南中医药大学药学院,河南郑州 450046)

摘要:以不同类型牛膝种子为试验材料,研究牛膝种子的净度、含水量、千粒质量、生活力、发芽率等指标,通过相关性分析和K均值聚类制定牛膝种子的质量分级标准,并对种子分级标准进行大田验证。结果表明,不同类型牛膝种子的净度、含水量、千粒质量、生活力和发芽率均存在差异,发芽率与千粒质量、生活力显著或极显著相关,相关系数分别为0.369、0.865,其余指标间均无相关性;K均值聚类将牛膝种子(秋子、蔓藁子)质量分为3个等级,其中发芽率、千粒质量及生活力可作为分级的重要指标;田间试验结果表明,各等级的牛膝种子(秋子、蔓藁子)在出苗率、单株质量、产量及质量指标中均存在差异,均表现为Ⅰ级>Ⅱ级>Ⅲ级。结果显示,本研究制定的牛膝种子质量分级标准可行,可以为牛膝种子种植技术的研究提供科学依据。

关键词:牛膝;种子;秋子;蔓藁子;种子质量分级标准;K均值聚类分析

中图分类号:S567.23⁺9.024 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)20-0149-05

牛膝(*Achyranthes bidentata* Bl.)为苋科多年生草本植物,主要以干燥根入药^[1],是驰名中外的四大怀药之一,具有补肝肾、强筋骨、引血下行、逐瘀通经的功效^[2]。牛膝主产区分布在河南、河北、内蒙古等地区,繁殖方式以种子繁殖为主,种子分为秋子和蔓藁子^[3]。河南地区牛膝种子繁殖类型有秋子和蔓藁子,而内蒙古、河北等地区的繁殖类型为蔓藁子。目前,我国的中药材种子质量分级标准研究处于起步阶段,且绝大部分中药材种子没有相应的种子质量分级标准,造成了中药材种子市场混乱,种子质量良莠不齐,而药用植物种子的质量是提高中药材产量、品质、高效的基础^[4-5],因此急需制定种子质量标准。此外,国内外关于牛膝种子分级标准的研究报道甚少,仅祁建军等对牛膝种子质量分级研究进行了报道^[6-7]。本试验通过对不同类型牛膝种子各项指标进行研究,结合大田验证,以制定牛膝种子质量分级标准。

1 材料与方法

1.1 试验材料

收集2017年河南省温县和武陟县、内蒙古赤峰市、河北省安国市等地的牛膝种子35份(表1),经河南中医药大学董诚明教授鉴定为苋科植物牛膝(*Achyranthes bidentata* Bl.)的种子,于室温贮存,备用,种子检验于2017年3—6月在河南中医药大学实验室进行。

1.2 试验方法

1.2.1 净度及含水量 参照《农作物种子检验规程》中四分法扦样进行取样,种子净度、含水量的测定参照《农作物种子检验规程》中净度及水分测定方法进行^[8-9]。

1.2.2 千粒质量 从净种子中随机选取3份,每份1000粒,称质量,精确到0.001 g。

1.2.3 生活力 采用2,3,5-氯化三苯基四氮唑法(TTC法)测定生活力。将浸泡过夜的种子沿胚的中线纵切成两半,置于0.5% TTC溶液中避光染色3 h,胚染成红色的种子为有生活力的种子,100个半粒为1次重复,设3次重复。

1.2.4 发芽率 从净种子中随机取100粒种子,经蒸馏水冲洗后置于土壤发芽盒中,在室温为25℃条件下进行发芽试验,12 h光照、12 h黑暗培养,以胚根长为种子长的1/2作为发芽标准,每天观察种子萌发情况,萌发结束后统计发芽率。发芽率 = $n/N \times$

收稿日期:2019-12-05

基金项目:河南省软科学研究计划(编号:171100310500)。

作者简介:李曼(1992—),女,河南郑州人,硕士研究生,研究方向为中药材规范化种植技术研究。E-mail:liman24533@163.com。

通信作者:董诚明,教授,研究方向为中药材规范化种植技术研究。

E-mail:dcm371@sohu.com。

表1 样品采集信息表

编号	种子类型	采集地	经度(E)	纬度(N)
Q1	秋子	焦作市武陟县大封镇东岩村	113°14'11.1"	34°59'15.8"
Q2	秋子	焦作市武陟县大封镇东岩村	113°14'35.9"	34°59'43.3"
Q3	秋子	焦作市武陟县大封镇驾部二村	113°14'39.9"	34°59'42.5"
Q4	秋子	焦作市武陟县大封镇驾部二村	113°14'43.1"	34°59'46.2"
Q5	秋子	焦作市武陟县大封镇驾部三村	113°14'58.6"	34°59'04.1"
Q6	秋子	焦作市武陟县大封镇驾部三村	113°15'08.0"	34°58'50.3"
Q7	秋子	焦作市武陟县大封镇黄河滩	113°15'18.2"	34°58'35.7"
Q8	秋子	焦作市武陟县大封镇黄河滩	113°15'23.2"	34°58'28.5"
Q9	秋子	焦作市武陟县大封镇西唐郭村	113°15'21.7"	34°58'19.6"
Q10	秋子	焦作市武陟县大封镇西唐郭村	113°15'32.2"	34°58'15.9"
Q11	秋子	焦作市温县赵堡镇南崔庄村	113°12'03.8"	34°58'57.3"
Q12	秋子	焦作市温县赵堡镇南崔庄村	113°11'14.3"	34°58'42.2"
Q13	秋子	焦作市温县赵堡镇南崔庄村	113°10'35.4"	34°58'09.8"
Q14	秋子	焦作市温县南张羌镇北张羌村	113°08'43.8"	34°57'37.4"
Q15	秋子	焦作市温县南张羌镇北张羌村	113°07'51.6"	34°57'15.5"
Q16	秋子	焦作市温县南张羌镇徐沟村	113°07'01.9"	34°57'04.3"
M17	蔓藎子	焦作市武陟县大封镇东岩村	113°14'51.8"	34°59'14.0"
M18	蔓藎子	焦作市武陟县大封镇驾部二村	113°15'12.4"	34°59'25.7"
M19	蔓藎子	焦作市武陟县大封镇驾部二村	113°14'53.2"	34°59'21.9"
M20	蔓藎子	焦作市武陟县大封镇驾部三村	113°15'21.7"	34°58'19.6"
M21	蔓藎子	焦作市武陟县大封镇黄河滩	113°16'11.9"	34°58'43.5"
M22	蔓藎子	焦作市武陟县大封镇黄河滩	113°16'03.5"	34°58'57.6"
M23	蔓藎子	焦作市武陟县大封镇黄河滩	113°15'56.3"	34°59'09.8"
M24	蔓藎子	焦作市武陟县大封镇西唐郭村	113°15'32.7"	34°59'37.0"
M25	蔓藎子	焦作市武陟县大封镇西唐郭村	113°15'22.1"	34°59'32.8"
M26	蔓藎子	焦作市武陟县大封镇驾部二村	113°15'47.0"	34°59'25.0"
M27	蔓藎子	焦作市温县赵堡镇南崔庄村	113°09'34.9"	34°58'06.2"
M28	蔓藎子	焦作市温县赵堡镇南崔庄村	113°10'38.3"	34°58'20.8"
M29	蔓藎子	焦作市温县南张羌镇北张羌村	113°06'16.4"	34°56'48.8"
M30	蔓藎子	赤峰市牛营子镇牛营子村	118°47'40.9"	42°06'34.0"
M31	蔓藎子	赤峰市牛营子镇牛营子村	118°47'35.7"	42°06'31.7"
M32	蔓藎子	赤峰市牛营子镇牛营子村	118°47'51.2"	42°06'32.7"
M33	蔓藎子	安国市西佛落镇大营村	115°20'16.0"	38°28'49.3"
M34	蔓藎子	安国市西佛落镇大营村	115°20'21.8"	38°28'54.1"
M35	蔓藎子	安国市西佛落镇大营村	115°20'05.2"	38°28'47.0"

100%。其中: n 为最终发芽数; N 为供试种子数。

1.2.5 田间验证试验 试验于2017年在河南省焦作市武陟县大封镇驾部村进行(113°14'40"E, 34°59'32"N)。土壤状况:全氮含量为1500 mg/kg,速效磷含量为3.825 mg/kg,速效钾含量为120 mg/kg,有机质含量为12.25 g/kg,pH值为9.13。采用随机区组试验设计,选取秋子和蔓藎子每个等级样品设置田间小区,每份种子3次重复,小区面积为

6 m²。2017年7月11日播种,7月28日观察田间出苗率,11月26日采收,记录单株鲜质量及产量,随后将样品带回实验室,采用高效液相色谱法(HPLC法)测定 β -蜕皮甾酮和齐墩果酸的含量^[10-11]。

1.3 数据分析

应用SPSS和DPS统计软件,对发芽率、活力、千粒质量、水分、净度等指标结果进行相关性分析和K均值聚类分析,制定牛膝种子质量分级标

准,对田间验证试验指标进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 牛膝种子分级指标结果

2.1.1 净度 如表2所示,秋子平均净度为83.92%,其中Q1种子的净度最高,Q11种子的净度最低;蔓藎子平均净度为86.77%,其中M26种子的净度最高,M31种子的净度最低。

2.1.2 含水量 不同类型牛膝种子水分测定结果见表2。从表2中可以看出,秋子含水量范围为9.60%~11.42%,其中含水量最低的为Q12,最高的为Q3;蔓藎子含水量范围为9.70%~12.50%,其中含水量最高的为M26,最低的为M32。

2.1.3 千粒质量 不同类型牛膝种子千粒质量测定结果见表2。由表2可知,秋子千粒质量范围为1.559 2~3.285 4 g,其中千粒质量最低的为Q8,最高的为Q1;蔓藎子千粒质量范围为2.690 6~4.191 2 g,其中千粒质量M30最高,M32最低。

2.1.4 生活力 不同类型牛膝种子生活力测定结果见表2。由表2可知,秋子生活力范围为52.00%~96.00%,其中最低的为Q7,最高的为Q16;蔓藎子生活力范围为45.00%~99.00%,其中最高的为M29,最低的为M21。可见,各地的秋子及蔓藎子生活力存在差别。

2.1.5 发芽率 不同类型牛膝种子发芽率测定结果见表2。发芽率反映种子质量的优劣,由表2可知,秋子平均发芽率为77.06%,其中Q1的最高(98.00%),Q8的最低(37.00%);蔓藎子平均发芽率为77.58%,其中M29的最高(98.00%),M32的最低(51.00%)。

2.2 相关性分析

对牛膝种子净度、千粒质量、含水量、生活力及发芽率指标进行相关性分析,结果见表3。由表3可知,发芽率与千粒质量、生活力显著或极显著相关,相关系数分别为0.369、0.865,其余指标间的相关性均不显著,表明千粒质量、生活力、发芽率为牛膝种子重要的质量指标。

2.3 质量分级标准的初步制定

采用分析软件SPSS对牛膝种子(秋子、蔓藎子)5个指标进行系统聚类分析,结果见图1、图2。再结合相关性分析及K均值聚类分析结果(表4、表5),选取千粒质量、生活力及发芽率等3个指标初步制定了秋子和蔓藎子的质量分级标准(表6、表7)。

表2 牛膝种子各项指标测定值

编号	净度 (%)	含水量 (%)	千粒质量 (g)	生活力 (%)	发芽率 (%)
Q1	98.53	10.76	3.285 4	89.00	98.00
Q2	97.22	10.76	3.261 2	87.00	97.00
Q3	93.81	11.42	2.749 6	92.00	93.00
Q4	89.46	11.14	2.711 3	94.00	92.00
Q5	89.76	10.53	1.817 9	67.00	55.00
Q6	94.86	10.82	2.439 4	80.00	78.00
Q7	96.91	10.93	2.123 8	52.00	40.00
Q8	93.41	11.04	1.559 2	50.14	37.00
Q9	94.40	11.12	3.083 1	76.00	88.00
Q10	93.98	11.22	2.605 6	89.00	81.00
Q11	63.62	9.67	2.634 1	78.00	61.00
Q12	68.85	9.60	2.975 2	88.00	79.00
Q13	66.08	9.78	2.018 1	53.63	44.00
Q14	69.24	10.92	1.976 2	88.33	81.00
Q15	66.85	10.80	2.564 9	62.00	52.00
Q16	65.87	10.58	2.947 8	96.00	95.00
M17	91.69	11.85	4.053 4	85.47	79.00
M18	81.65	11.62	4.116 7	88.00	76.00
M19	79.83	12.04	3.455 7	64.49	56.00
M20	80.48	12.20	3.567 6	62.00	57.00
M21	81.30	12.33	4.146 7	45.00	50.00
M22	88.61	12.40	3.851 2	97.00	90.00
M23	88.63	12.46	3.343 6	85.00	96.00
M24	94.51	12.14	3.974 3	70.00	64.00
M25	94.21	12.25	3.616 4	94.00	96.00
M26	95.62	12.50	2.802 1	80.33	71.00
M27	92.68	10.21	3.447 4	96.00	91.00
M28	93.59	10.21	2.752 5	75.00	70.00
M29	93.55	10.07	3.885 3	99.00	98.00
M30	65.71	9.98	4.191 2	82.44	83.00
M31	55.33	9.77	3.367 2	71.63	61.00
M32	91.89	9.70	2.690 6	63.09	51.00
M33	91.94	10.81	4.015 6	91.00	96.00
M34	93.46	10.70	3.472 6	94.00	87.00
M35	94.04	10.62	2.715 4	62.96	77.00

表3 牛膝种子质量各指标间的相关系数

指标	相关系数			
	净度	含水量	千粒质量	生活力
含水量	0.286			
千粒质量	-0.075	0.284		
生活力	0.102	0.011	0.316	
发芽率	0.276	0.069	0.369*	0.865**

注:“*”表示显著相关($P < 0.05$),“**”表示极显著相关($P < 0.01$)。

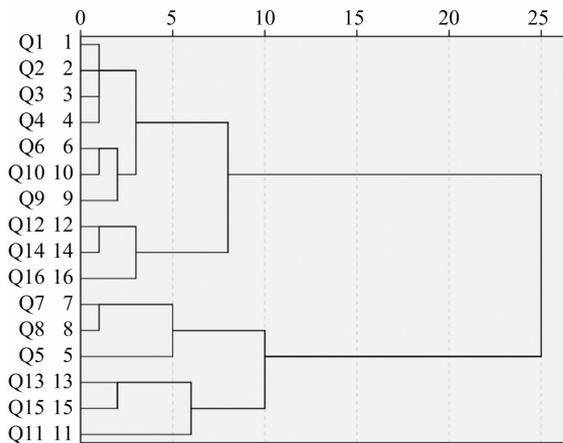


图1 秋子聚类分析树状图

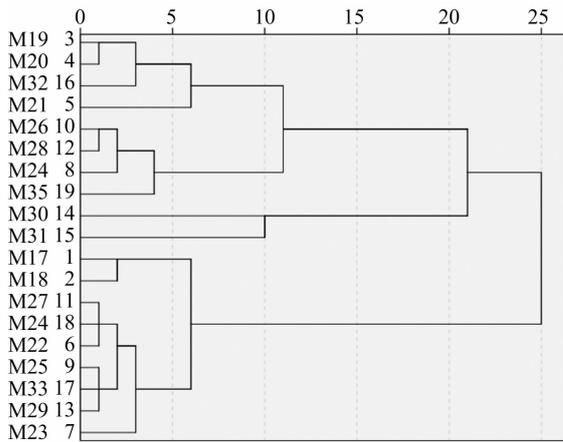


图2 蔓蓇子聚类分析树状图

表4 秋子K均值聚类分析结果(n=16)

级别	聚类中心值					种子分级情况 (样本数)
	净度 (%)	含水量 (%)	千粒质量 (g)	发芽率 (%)	生活力 (%)	
I	94	11	2.88	86	89	7
II	82	10	2.02	56	45	5
III	66	10	2.63	87	79	4

表5 蔓蓇子K均值聚类分析结果(n=19)

级别	聚类中心值					种子分级情况 (样本数)
	净度 (%)	含水量 (%)	千粒质量 (g)	发芽率 (%)	生活力 (%)	
I	90	11	3.76	92	89	9
II	88	11	3.26	65	62	8
III	60	9	3.78	77	72	2

秋子分级标准:千粒质量 ≥ 2.85 g,发芽率 $\geq 86\%$,生活力 $\geq 87\%$,同时符合这3个指标的为I级种子;千粒质量 ≥ 2.02 g,发芽率 $\geq 56\%$,生活力 $\geq 45\%$,同时符合这3个指标的为II级种子;不符合I、II级标准的种子归为III级种子,生产中不建议

表6 秋子质量分级标准

级别	分级指标		
	千粒质量(g)	发芽率(%)	生活力(%)
I	≥ 2.85	≥ 86	≥ 87
II	≥ 2.02	≥ 56	≥ 45
III	2.02	56	45

表7 蔓蓇子质量分级标准

级别	分级指标		
	千粒质量(g)	发芽率(%)	生活力(%)
I	≥ 3.75	≥ 90	≥ 88
II	≥ 3.26	≥ 60	≥ 55
III	3.26	60	55

使用。

蔓蓇子分级标准:千粒质量 ≥ 3.75 g,发芽率 $\geq 90\%$,生活力 $\geq 88\%$,同时符合这3个指标的为I级种子;千粒质量 ≥ 3.26 g,发芽率 $\geq 60\%$,生活力 $\geq 55\%$,同时符合这3个指标的为II级种子;不符合I、II级标准的种子归为III级种子,生产中不建议使用。

2.4 田间验证试验结果

选用秋子及蔓蓇子各等级3个样品进行田间种植试验,试验结果见表8、表9。由表8可知,秋子各等级在出苗率、单株质量及产量等指标中存在显著性差异,均表现为I级>II级>III级,各等级的 β -蜕皮甾酮及齐墩果酸含量差异不明显。由表9可知,蔓蓇子各等级在出苗率、单株质量、产量及齐墩果酸含量等指标中存在差异,均表现为I级>II级>III级,各等级的 β -蜕皮甾酮含量无显著性差异。整体上秋子和蔓蓇子各等级的指标均表现为I级>II级>III级。

3 讨论与结论

种子优劣是决定药材种植、生产、加工后能否获得后期药材高产、优质、稳定的关键,特别是无害的中药材,种子质量监控更是不可或缺^[12]。本研究表明,不同类型牛膝种子的质量存在差异。相关性分析结果表明,千粒质量、发芽率与生活力为牛膝种子的重要质量指标,发芽率可以反映田间出苗情况,其数值的高低决定了种子的田间利用价值^[13],千粒质量反映了种子饱满程度和成熟情况,生活力反映了种子发芽潜力或种胚生命力,可以侧面反映种子的质量。采用K均值聚类分析法对35批牛膝

表8 秋子田间试验指标结果

级别	出苗率 (%)	单株质量 (g)	产量 (kg/667 m ²)	β -蜕皮甾酮含量 (%)	齐墩果酸含量 (%)
I	47.33a	18.92 ± 0.57a	497.5 ± 14.70a	0.050 1 ± 0.007 3a	1.187 4 ± 0.044 2a
II	28.33b	17.31 ± 0.38b	452.2 ± 17.75b	0.041 0 ± 0.002 7ab	1.088 3 ± 0.019 6ab
III	19.67c	15.75 ± 0.65c	359.4 ± 29.45c	0.036 5 ± 0.005 2b	0.997 5 ± 0.111 0b

注:同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。表9同。

表9 蔓藁子田间试验指标结果

级别	出苗率 (%)	单株质量 (g)	产量 (kg/667 m ²)	β -蜕皮甾酮含量 (%)	齐墩果酸含量 (%)
I	44.67a	18.68 ± 0.09a	475.2 ± 2.78a	0.044 7 ± 0.004 3a	1.153 0 ± 0.074 0a
II	30.67b	17.36 ± 1.48ab	427.1 ± 25.82b	0.042 6 ± 0.002 3a	1.048 4 ± 0.053 1ab
III	16.33c	15.31 ± 1.57b	376.1 ± 26.27c	0.041 3 ± 0.005 0a	1.008 3 ± 0.059 6b

种子进行质量评价研究,已知分类数量的情况下,对秋子及蔓藁子质量进行分级^[14],该方法在多种药用植物种子质量研究中均有应用^[15-19],最终将秋子与蔓藁子均分为3个等级。田间种植试验结果显示,秋子和蔓藁子各等级在出苗率、单株质量、产量、 β -蜕皮甾酮含量及齐墩果酸含量等方面均表现均为 I 级 > II 级 > III 级,有力证明了秋子和蔓藁子质量分级标准的科学性。

随着中药材种植行业的快速发展,中药材种子的需求越来越大,但因缺乏相应的种子质量标准,导致中药材质量差异较大,因此急需制定种子质量分级标准,从药材的源头——种子质量入手来控制药材质量。

参考文献:

- [1] 尚风琴. 怀牛膝与川牛膝功能活性成分的比较研究[D]. 武汉:中国科学院研究生院(武汉植物园),2016.
- [2] 张红瑞,兰金旭,扶胜兰,等. 不同繁殖类型怀牛膝生长发育特性研究[J]. 中国农学通报,2010,26(20):118-121.
- [3] 焦作市科技局. 四大怀药[M]. 郑州:中原农民出版社,2004:395.
- [4] 王媛媛,彭亮,肖建玮,等. 远志种子质量分级标准考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(17):33-41.
- [5] 李秀凤,葛淑俊,王静华. 药用植物种子标准化研究进展[J]. 中草药,2009,40(5):附4-附7.
- [6] 祁建军,李先恩,周丽莉,等. 牛膝种子质量研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(15):2038-2041.
- [7] 淡红梅. 甘草、丹参、牛膝种子检验规程与质量分级标准的研究[D]. 北京:中国协和医科大学,2006.
- [8] 许红艳,李章成,丁德蓉. 冬凌草的栽培与利用[J]. 特种经济动植物,2004,7(2):28-30.
- [9] 国家技术监督局. 农作物种子检验规程:GB/T 3543—1995[S]. 北京:中国标准出版社,1995.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [11] 仇立志. 硫磺熏蒸对怀牛膝饮片质量的相关性评价[D]. 济南:山东中医药大学,2012.
- [12] 魏良柱. 陕西地区丹参种子质量标准研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2016:14-15.
- [13] 赵艳,李安平,孙斌,等. 连翘种子质量标准研究[J]. 园艺与种苗,2014(4):29-33.
- [14] 李晓琳,黄璐琦,李颖,等. 刺五加种子质量分级标准研究[J]. 现代中药研究与实践,2017,31(2):50-53.
- [15] 彭亮,孙涛,王媛媛,等. 陕产茜草种子质量分级标准研究[J]. 中南药学,2017,15(9):1224-1227.
- [16] 郭巧生,张贤秀,王艳茹,等. 夏枯草种子品质检验及质量标准初步研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(7):812-816.
- [17] 李红莉,徐有明,李隆云,等. 青蒿种子品质检验及质量标准的研究[J]. 种子,2008,27(11):1-4.
- [18] 胡璇,李卫东,李欧,等. 益母草种子质量分级标准研究[J]. 种子,2011,30(4):83-85.
- [19] 孙林霞,阮英恒,高昭,等. 阳春砂种子质量标准的研究[J]. 安徽农业科学,2015,43(21):83-84,156.