

doi:10.16104/j.issn.1673-1891.2022.02.002

华山松种子生活力四唑测定判定法

崔明霞,薛婷婷*

(滁州学院土木与建筑工程学院,安徽 滁州 239000)

摘要:以华山松种子为研究材料,通过研究不同质量分数(0.2%、0.5%)四唑溶液、不同染色温度和不同染色时间对华山松种子生活力的影响,探索出测定华山松种子生活力的最佳条件。通过萌发率对比,得出:在 30 ℃ 下用质量分数为 0.5% 的四唑溶液染色为最佳染色条件,且染色时间仅需要 5 h;胚全部染色,胚乳未染色面积小于 1/3 的种子具有生活力。

关键词:华山松;种子;四唑染色;生活力

中图分类号:S791.241 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-1891(2022)02-0005-03

Tetrazolium Method for Testing Seed Viability of *Pinus armandii* Franch.

CUI Mingxia, XUE Tingting*

(School of Civil and Architectural Engineering, Chuzhou University, Chuzhou, Anhui 239000, China)

Abstract: This article studied the influence of different concentration of tetrazolium solution (0.2%, 0.5%), dyeing temperature and dyeing time to figure out the best staining condition. Comparison of the germination percentages has got determination patterns of *P. armandii* seeds; the best testing condition for *P. armandii* seed viability determination was 5 h staining with 0.5% TTC at 30 ℃ under darkness; embryo fully stained and less than 1/3 portions of endosperm unstained are viable seeds.

Keywords: *Pinus armandii* Franch.; seed; tetrazolium staining; viability

0 引言

华山松 (*Pinus armandii* Franch.) 为松科 (*Pinaceae*) 松属 (*Pinus*) 高大乔木,原产于中国,因集中产于陕西的华山而得名,集材用、观赏、种子食用等多种用途。种子生活力的高低直接影响到植物栽培,在对华山松的需求日益增大的情况下,加强种子检验显得十分重要。

种子生活力是指种子能够萌发的潜在能力或种胚所具有的生命力,它决定着种子或种胚在发芽和出苗期间活力水平和行为的综合表现,是评价种子品质的重要指标之一^[1-3]。检测种子生活力主要采用四唑试验和标准发芽试验^[4-6]。四唑检验原理为四唑溶液穿透生物组织,与氢离子释放的酶参与呼吸过程形成不溶性红色化合物,所以呼吸组织被染成红色^[7-9]。四唑溶液染色因其快速高效准确等

特点,已经成为检验种子品质的重要手段^[10-12]。

华山松种子存在休眠,且萌发时间长,标准萌发实验难以直接、迅速检验其萌发情况^[13-14];也有报道以 X 射线水衬比法测定华山松种子生活力^[14],但该方法操作较复杂,且不能精确判断单粒种子中各组织与各区域的细胞存活情况。因此选择四唑染色是测定华山松种子生活力的较好方式。

对于不同植物种类,最适宜的四唑溶液质量分数、染色时间和预处理方式均有不同;四唑染色能够判定种子中各个组织与各个区域的存活情况,但不同组织与不同区域的存活模式对不同植物种类的萌发与成苗的影响不同,因此不同的物种也存在不同的生活力判定方式。本文从染色条件与生活力判定角度对以四唑染色方式测定华山松种子生活力进行研究。

收稿日期:2021-12-20

基金项目:安徽省教育厅高校人文社科研究一般项目(SK2021B19);安徽省滁州市 2021 年市社科应用对策研究课题(B2021002);滁州学院科研启动金项目(2020qd33、2021qd05)。

作者简介:崔明霞(1991—),女,安徽芜湖人,讲师,硕士,研究方向:风景园林植物。*通信作者:薛婷婷(1991—),女,江苏南京人,讲师,博士,研究方向:植物学。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

华山松种子由滁州学院种子中心实验室提供。种子纵径 $11.620\ 4 \pm 1.04\ \text{mm}$, 横径 $7.732\ 4 \pm 0.62\ \text{mm}$, 种子千粒质量 $242.408\ \text{g}$ 。

四唑试剂为仅供科研使用的飞净(phygene)牌 PH1792(红四氮唑)。

1.2 方法

预处理:从充分混合的种子中,随机选取种子剥去种壳^[15],浸泡 12 h 后,将种仁用刀片通过胚中轴的中部纵向切开使胚根和组织暴露在四唑溶液中。

四唑配制:根据国家标准林木种子检验规程 GB2772—1999^[16]的规定,配制质量分数为 0.5% 和 0.2% 的四唑溶液。

四唑染色:将预处理的种子分别放入质量分数为 0.5% 和 0.2% 的四唑溶液中,使溶液淹没种仁,而后分别放入 15、20、25、30 °C 的恒温培养箱中避光染色,每个试验处理 50 粒种子,并进行 4 次生物学重复。每隔 1 h 观察记录一次,观察至连续 3 次记录无明显变化为止。

观察鉴定:染色结束后,沥去溶液,用清水冲洗,将种子摆在湿润的滤纸上。逐粒记录种子染色的区域。

萌发试验:种子吸胀 10 d 后,与湿沙混合均匀,在 4 °C 条件下层积 60 d,然后置于 4 层湿润滤纸上,放入 10、15、20、25、30 °C 恒温光照培养箱中培养,培养 45 d,每天记录种子萌发情况。萌发试验每次取 100 粒种子,重复 3 次试验。以形成正常幼苗作为萌发标准^[17]。

数据处理:所得数据用 SPSS19 软件进行方差分析与多重比较。

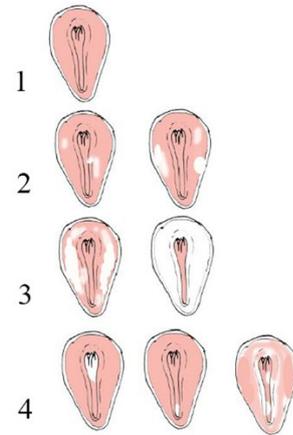
2 结果与分析

2.1 不同条件下染色结果

观察染色后的华山松种子,整理为 4 种染色模式,如图 1 所示。本次试验未出现胚完全不着色的情况。

将华山松种子种仁用刀片通过胚中轴的中部纵向切开后,在不同质量分数(0.2%、0.5%)的四唑试剂(TTC)和不同染色温度条件下的染色结果如表 1 所示。

判定最佳染色条件时,仅选择染色模式 1,即胚与胚乳完全染色的情况进行多重比较。结果表明:



注:1.胚和胚乳完全染色;2.胚完全染色,少于 1/3 部分的胚乳未染色;3.胚完全染色,多于 1/3 的子叶未染色;4.胚部分未染色(胚根,子叶,胚轴的部分或全部未染色),胚乳全部或部分染色。

图 1 华山松种子四唑不同染色模式

表 1 不同质量分数的 TTC 与不同温度下的种子染色结果

TTC 质量 分数/%	染色 温度/°C	染色率/%				染色 时间/h
		模式 1	模式 2	模式 3	模式 4	
0.2	15	50e	18	20	8	15a
	20	58c	18	16	8	15a
	25	60cd	16	19	7	9b
	30	63bc	13	15	7	5c
0.5	15	56d	20	13	6	15a
	20	65b	23	7	5	15a
	25	68b	20	5	5	9b
	30	75a	17	4	4	5c

注:同列不同小写字母表示数据间的差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

在 30 °C 条件下,以质量分数为 0.5% 的四唑溶液染色,染色率最高,达到 75%,显著高于其他染色条件下的染色率($P < 0.05$)。而染色时间在 30 °C 条件下,无论四唑溶液质量分数为 0.2% 或 0.5%,均低于其他染色温度下的染色时间,仅需 5 h。因此,在 30 °C 条件下,质量分数为 0.5% 的四唑溶液为最佳染色条件。

2.2 萌发率结果

表 2 和表 3 为华山松种子在不同温度的恒温培养箱中的萌发情况。华山松种子在 20 °C 萌发率最高,为 90%,且开始萌发时间最早,第 4 d 开始萌发;在 15 °C 时萌发率为 89%;在 25 °C 时萌发率为 79%;培养温度为 10 °C 时,种子萌发率为 61%,且有 21% 种子未萌发,也未腐烂;培养温度为 30 °C 时,萌发率最低,为 28%,腐烂率也高达 39%,萌发开始时间最迟,为 15 d。

表2 不同温度下华山松种子萌发率

发芽温度/℃	发芽率/%	未发未腐烂/%	腐烂率/%
10	61±2c	21±6b	18
15	89±7a	1±1c	10
20	90±3a	0c	10
25	79±6b	3±3c	18
30	28±4d	33±8a	39

注:同列数值后英文字母不同表示差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表3 不同温度下华山松种子的发芽时间

发芽温度/℃	开始萌发时间/d	发芽结束时间/d
10	14	30
15	5	26
20	4	24
25	4	26
30	15	26

2.3 染色结果判定

由表1可知,在四唑溶液质量分数为0.5%,温度为30℃时,染色结果最佳。故采用此条件下的染色结果来判定有生活力的种子染色模式。华山松种子吸胀后放入20℃恒温培养箱中萌发45d后,计算萌发率为(90±3)%。表4显示判定染色后有生活力的类型和其对应的萌发率结果,并对比不同类型比例染色率数值与萌发率数值的差异。染色模式1为胚乳与胚全部着色,显然应作为有生活力的种子。因此判定时,比较染色模式1与染色模式2、3、4的各种组合的情况所占比例与萌发率的差异。

表4 染色后华山松种子有生活力的类型及其萌发率

染色类型	染色率/%	(染色率-萌发率)/%
1	75	15a
1+2	92	2d
1+3	79	11b
1+4	79	11b
1+2+3	96	6c
1+2+4	96	6c
1+3+4	83	7c
1+2+3+4	100	10b

注:同列不同的字母表示数据间差异有统计学意义($P < 0.05$)。

参考文献:

- [1] 颜启传.种子学[M].北京:中国农业出版社,2001.
- [2] 黄燕芬,潘春柳,梁耀丹,等.四唑染色法测定抗肿瘤中药半枝莲种子生活力的研究[J].种子,2011,30(6):110-111.
- [3] 周政贤.中国马尾松[M].北京:中国林业出版社,2001,1-4.
- [4] International seed testing association. ISTA Working sheets on tetrazolium testing[M]. Switzerland: Bassersdorf, 2003.

采用染色判读类型和萌发率的差异分析,如表4所示,显示了类型1和类型2的数据结果和种子萌发率(90%)结果相比差异性最小,仅2%,显著低于其他组合情况,其差异具有统计学意义($P < 0.05$)。也就是说,除了胚和胚乳完全染色的情况外,胚完全染色且胚乳染色比例不低于2/3的种子也具有生活力。

3 结论与讨论

1) 试验表明:在30℃下用质量分数为0.5%的四唑溶液染色,为最佳染色条件,且染色时间仅需要5h;胚全部染色,胚乳染色面积不小于2/3的种子具有生活力。

2) 试验结果表明:在30℃条件下染色优于前人提出的20℃条件下染色^[13],而在很多情况下,30~35℃的染色条件均优于较低的温度,30~35℃也是很多植物的建议染色温度^[17]。

3) 虽然统计结果显示,染色模式3和染色模式4不宜判作有生活力的种子,但由于本试验所用的该批次白皮松种子生活力较高,染色模式3与4所占的比例较低,对于种胚的染色所得的染色类型较少,因此很难判断胚根、胚轴或子叶的小部分面积未染色时,对种子整体质量的影响,没有数据说明种子是否还具有生活力。因此还需以中、低等生活力的种子进行研究,获得更精细的判读标准。

4) 对比染色率与萌发率时所用的萌发标准,一般的萌发结果往往有3种判断类型:胚根突破种皮;胚根生长到一定程度,或形成正常幼苗;田间出苗率。这3种萌发标准类型适用的情况不同。胚根突破种皮往往作为生理层面的萌发标准^[18-20],多用于种子休眠的研究;虽然种子的生活力被定义为萌发的潜在能力或种胚所具有的生命力,但国际上使用产生正常幼苗作为种子有生活力的标准^[17],那些胚根能够突破种皮但不能形成正常幼苗的种子不被认为具有生活力。有时四唑染色的结果也被用于预判田间成苗率,这是由于四唑染色也能用于判定种子活力。种子在大田萌发时,受环境影响,低活力的种子萌发后不能存活,而四唑染色也可以通过特定的染色模式鉴别出不适宜田间萌发的种子。

- [11] 刘其源.超高强度钢板热成形模具冷却系统设计及数值模拟研究[D].重庆:重庆理工大学,2014.
- [12] 涂小文.AutoForm 原理技巧与战例使用手册[M].湖北:湖北科学技术出版社,2013.
- [13] 龚红英.金属塑性成形 CAE 应用-DYNAFORM[M].北京:化学工业出版社,2015.
- [14] 胡建军,李小平.DEFORM-3D 塑性成形 CAE 应用教程[M].北京:北京大学出版社,2020.
- [15] 闫盖,郑燕萍,张文彦,等.基于正交试验的板料冲压成形工艺参数优化[J].热加工工艺,2013,42(17):94-97.
- [16] 郝洪艳,倪飞,杨阳,等.基于正交试验的钢质气瓶封头拉深成形工艺参数优化研究[J].热加工工艺,2021,50(5):98-101+105.
- [17] 么大锁.汽车引擎盖外板拉延成形工艺参数优化研究[J].机电工程,2020,37(7):795-800.
- [18] 夏琴香,熊盛勇,潘兴毅,等.不锈钢/铝/不锈钢复合板拉深工艺及有限元数值模拟[J].精密成形工程,2016,8(2):37-42.

(上接第 7 页)

- [5] GUPTA B N,RATURI A S.Tetrazolium staining of seeds for interpretation of viability for six Indian tree species[J].Indian Forester,1975,101(11):659-673.
- [6] SAWMA J T,MOHLER C L.Evaluating seed viability by an unimbibed seed crush test in comparison with the tetrazolium test [J].Weed Technology,2002,16(4):781-786.
- [7] HARRADINE A R.Seed longevity and seedling establishment of bromus diandrus roth[J].Weed Research,1986,26(3):173-180.
- [8] LEGUIZAMON E S.Seed survival and patterns of seedling emergence in Sorghum halepense(L.) pers[J].Weed Research,1986,26(6):397-403.
- [9] GROSS K L.A comparison of methods for estimating seed numbers in the soil[J].Journal of Ecology,1990,78:1079-1093.
- [10] GOPAL M,THAPLIYAL R C.Topographical tetrazolium test of Indian tree seeds[J].Van Vigan,1969,7:37-45.
- [11] PASHA M K,DAS R K.Quick viability test of soybean seeds by using tetrazolium chloride[J].Seed Science and Technology,1982,10:651-655.
- [12] BABELEY G S,KANDYA A K.Use of TTC for rapid testing of viability of Lagerstoemia parviflora Roxb seeds[J].Journal of Tropical Forestry,1986,2:226-231.
- [13] 余佳荣,宋自力,唐强等.华山松种子发芽影响因素和生活力检验方法研究[J].湖南林业科技,2011,38(6):41-42.
- [14] 李基平,钟淑英.X 射线水衬比法测定华山松种子生活力的研究[J].西部林业科学,1998(4):21-27.
- [15] ASLAM M,RESHI Z A,SIDDIQI T O.Standardization of seed viability protocol for Pinus wallichiana A.B.Jackson in Kashmir, India[J].International Journal of Pharmaceutical Sciences Review & Research,2010,4(3):93-98.
- [16] 国家质量技术监督局.林木种子检验规程 GB2772-1999[S].北京:中国标准出版社,1999.
- [17] AOSA.Tetrazolium testing handbook[M].North Brunswick,N.J.:Association of Official Seed Analysts,2000.
- [18] CORBINEAU F,COME D.Some particularities of the germination of Oldenlandia corymbosa L.seeds(tropical Rubiaceae)[J].Israel J.Bot,1981,29:157-167.
- [19] FIGUEROA R,DOOHAN D,CARDINA J,et al.Common groundsel(Senecio vulgaris) seed longevity and seedling emergence [J].Weed Sci,2007,55(3):187-192.
- [20] LEON R G,BASSHAM D C,OWEN M D K.Thermal and hormonal regulation of the dormancy-germination transition in Amaranthus tuberculatus seeds[J].Weed Res,2007,47(4):335-344.