

· 种子检验 ·

三七种子质量检验规程研究

张蕊蕊^{1,2}, 孙卫邦¹

(1. 中国科学院昆明植物研究所昆明植物园, 昆明 650201;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

Study on Seed Testing Rules of *Panax Notoginseng*ZHANG Rui-rui^{1,2}, SUN Wei-bang¹

摘要: 参考《国际种子检验规程》(ISTA) 1996 版和 GB/T 3543.1~3543.7-1995《农作物种子检验规程》的方法和要求,通过对三七地理标志产地云南省文山州不同种源的三七种子进行扦样、净度分析、真实性鉴定、千粒重测定、水分测定、生活力测定和发芽试验 7 项指标检验方法的研究,确定其标准检验方法,为三七种子质量分级标准的制定提供依据。

关键词: 三七; 种子; 检验规程

中图分类号: S567.23+6 **文献标志码:** A

文章编号: 1001-4705(2012)03-0119-05

三七为我国名贵中药材,其基原为五加科(Araliaceae)人参属植物三七(*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen)的干燥根及根茎^[1],始见于李时珍《本草纲目》,具有良好的止血散瘀、定痛消肿功效,是著名的跌打损伤特效药^[2]。迄今尚未发现野生三七。据考证,我国人工栽培三七已有四百多年的历史^[3-4],主要栽培于云南省文山州和广西省右江流域^[5]。文山州是三七的主产区,其栽培面积和产量均占全国 90% 以上^[6]。

三七以种子进行育苗,1 年后移栽^[7],其种子寿命短,不耐贮藏^[7,8]。近年来,随着市场需求量的增加,三七种植面积逐渐增大,文山州三七种子不断流向各地。而种子的生产多为一家一户的小规模生产方式,无规范的采留种技术,致使种子质量参差不齐,造成三七药材产量和质量的不均一,并直接影响人们用药的有效和安全。种子检验是保证种子质量的重要措施^[9]。本研究在已有的三七种子特性的基础上^[7,8,10-12],参照 GB/T 19086-2008《地理标志产品——文山三七》,开展三七种子检验规程的研究,以

期为其种子质量分级标准的制定提供依据。

1 材料

2010 年 11 月~2011 年 1 月收集于云南省文山州各三七栽培区的三七种子。经中国科学院昆明植物研究所孙卫邦研究员鉴定为三七(*P. notoginseng*)的种子。试验于 2010 年 11 月~2011 年 6 月在昆明植物研究所植物园进行。

2 方法

2.1 扦样

2.1.1 种子批

根据三七种子的特性、市场流通情况和送验要求,确定三七种子批的最大质量和送验样品的最小质量。

2.1.2 扦取送验样品和试验样品

按 GB/T 3543.2-1995《农作物种子检验规程扦样》的要求执行。材料扦样后,干净纸袋包装,置于室内干燥、阴凉处保存。

2.2 种子净度分析

按 GB/T 3543.3-1995《农作物种子检验规程净度分析》规定执行。四分法从送验样品中扦取试验样品,并将其分成净种子、其他植物种子和杂质 3 种成分,测定各成分的重量百分比,重复 4 次。

2.3 种子真实性鉴定

采用种子形态鉴定法。随机数取种子 100 粒,重复 4 次,逐粒对大小、形状、颜色和表面构造进行观察并记录。

2.4 千粒重测定

按 GB/T 3543.7-1995《农作物种子检验规程其他项目检验》规定执行。分别采用百粒法、五百粒法和千粒法进行测定。(1) 百粒法:随机从净种子中数取 100 粒,重复 8 次,分别称重,计算标准差和变异系数;(2) 五百粒法:随机从净种子中数取 500 粒,重复 4 次,分别称重,计算标准差和变异系数;(3) 千粒法:随

收稿日期:2011-11-25

基金项目:重大新药创制国家科技重大专项“中药材种子种苗和种植(养殖)标准平台”(2009ZX09308-002)。

作者简介:张蕊蕊(1987-),女,河南济源人;在读硕士研究生,主要从事资源植物学方面的研究工作。

通讯作者:孙卫邦,E-mail:Wbsun@mail.kib.ac.cn。

机从净种子中数取1 000粒,重复4次,分别称重,计算标准差和变异系数。

2.5 含水量测定

采用烘干减重法测定三七种子含水量。按GB/T 3543.6-1995《农作物种子检验规程水分测定》规定执行。将样品盒预先烘干1 h(130~133℃)并放在硅胶干燥器中冷却备用。分别用低恒温法和高恒温法。(1)低恒温法:分别在(103±2)℃低恒温条件下,设置1、2、3、4、5、6、7、8、17 h计算种子水分损失量;(2)高恒温法:分别在(131±2)℃高恒温条件下,设置1、2、3、4、5、6 h计算种子水分损失量。每处理4次重复,每次重复(5±0.001)g。

2.6 生活力测定——四唑(TTC)测定

2.6.1 溶液配制

(1)缓冲溶液的配制:配制 KH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 的缓冲液,核查pH值,使其值保持在6.5~7.5的范围内。(2)梯度四唑溶液的配制:用上述缓冲溶液将TTC分别配成0.1%、0.5%、1.0%、1.5%4种质量分数的梯度溶液,阴凉处避光保存。

2.6.2 染色前的预处理

沿胚纵切,取半粒备用。

2.6.3 染色试验条件的确定

取上述备好的三七种子进行试验:时间梯度设为1、2、3、4 h,浓度梯度设为0.1%、0.5%、1.0%、1.5%,温度梯度设为30、35、40℃。每处理重复4次,每重复100粒种子。染色结束后,倒去染色液,清水冲洗3~5次,观察并计数。

2.6.4 有无生活力鉴定标准的确定

参照种子的发芽试验结果,建立三七种子四唑活力染色的鉴定标准。

2.7 发芽率测定

2.7.1 发芽前的抑菌试验

自来水(ck)、无菌水、0.1%高锰酸钾、0.2%高锰酸钾、1%次氯酸钠、1%百菌清各浸种10 min后,ck和无菌水浸种处理组直接置床,其余4处理组无菌水冲洗3次后置床。采用纸上法,置于10℃培养箱中光照培养,观察种子污染率。

2.7.2 适宜发芽床的确定

发芽床设3个处理:(1)纸上:培养皿中铺2层充分吸湿的滤纸,将预处理的种子均匀置床;(2)纸间:培养皿中铺2层充分吸湿的滤纸,将预处理的种子均匀置床,另外用1层滤纸松松地盖在种子上;(3)砂中:将拌好的含水量为20%的湿砂在培养皿内铺10 mm厚,种子均匀置床,加盖1层5 mm厚的松散湿砂。

培养条件为10℃光照培养。

2.7.3 适宜发芽温度的确定

纸上发芽床,发芽温度分别设为恒温5、10、15、20、25℃;昼夜12 h交替变温15/6、20/10、25/15、30/20、35/25℃。光照培养,观察种子萌发情况。

2.7.4 光照对发芽的影响试验

设光照、黑暗2种条件。光照处理为每天光照2 000 lx 12 h的条件下发芽;黑暗处理为将置床后的培养皿用4层黑布包裹,置于培养箱中进行发芽试验。纸上发芽床,10℃培养。

以上发芽试验,每处理4次重复,每重复50粒种子。

2.7.5 幼苗鉴定及试验持续时间

按《国际种子检验规程》中发芽试验和GB/T 3543.4-1995《农作物种子检验规程发芽试验》中幼苗鉴定的要求进行计数,并通过种子发芽情况确定试验持续时间。初次计数时间为胚根突破种皮2 mm时的天数,末次计数时间为种子萌发数达最高时的天数。

2.7.6 结果统计

试验结果以发芽率表示。发芽率(%)=试验结束时发芽的种子数/供试种子数×100%。

3 结果与分析

3.1 扦样

三七种子批的最大质量为5 000 kg。净度分析试样重量是按至少含有2 500粒种子推算而来^[3,14],据3.4结果,三七种子千粒重为74.4 g,2 500粒种子重量为223.2 g,考虑净度确定三七净度分析试样的最小重量为250 g。送验样品重量为净度分析量的10倍^[3,14],最少为2 500 g。

3.2 净度分析

试验中三七种子均由所收集的果实洗去果皮并阴干表面水分所得,试样均没有其他植物种子,亦无杂质,净度为100%。

3.3 真实性鉴定

三七成熟果实鲜红色,有光泽,肾形或球状肾形,少数三棱形。种子白色,三角状卵形,微具三棱。种皮2层,软骨质。长3.40~8.95 mm,宽3.23~7.85 mm,厚3.11~8.57 mm。千粒重54.53~91.37 g。

3.4 千粒重测定

随机选取经净度分析后的三七种子试样进行测定,结果见表1。百粒法、五百粒法和千粒法各处理间变异系数(CV)均小于4.0%。对3种方法测定的千粒重值进行多重比较,无显著差异。在实际操作中,百粒法为国际通用,且操作简便,为与国际接轨,从标准

化角度出发,选择百粒法作为三七种子千粒重的测定方法。

3.5 含水量测定

三七种子含水量测定结果见表2。高恒温试验法,1~6 h过程中,样品不断失去水分,没有较稳定的失去束缚水的过程可循;低恒温试验过程中,1~2 h有一个快速的失水期,2~6 h是一个较长时间缓慢失水的时期,6~8 h是一个比较显著的失水期,可以将这个快速失水期看作失去自由水,缓慢期看作失去束缚水,而其后较快的失水期为失去化合水。依据《1996 国际种子检验规程》,测定三七种子低恒温下17 h的含水量,与6 h相比无显著差异;且6 h从烘干时间上与GB/T 3543.6-1995《农作物种子检验规程水分测定》规定的时间较吻合。因此,使用103℃低恒温法烘干6 h测定三七种子含水量。

表2 不同烘干时间下三七种子失水量变化($\bar{x} \pm s$, $n=4$) %

烘干时间 (h)	高恒温烘干法 (131±2)℃	低恒温烘干法 (103±2)℃
1	61.11±0.55 a	53.34±1.66 a
2	61.44±0.55 a	59.92±1.07 b
3	61.40±0.55 a	60.87±0.94 bc
4	61.38±0.56 a	61.10±0.92 bc
5	61.45±0.55 a	61.32±0.91 bc
6	61.59±0.56 a	61.39±0.87 bc
7	—	61.50±0.93 c
8	—	61.66±0.91 c
17	—	61.36±0.90 bc

注:处理间多重比较采用LSD法,差异显著性分析取 $\alpha=0.05$ 水平,同一列中含有不同字母者为差异显著(表3~7同)。

3.6 生活力测定

3.6.1 染色试验条件的确定

三七种子染色情况受染色的时间、温度和染色液浓度的影响,试验结果见表3。四唑有毒性,且高浓度四唑液长时间染色反而会导致已着色部位褪色,从而影响试验结果。综合染色时间、浓度及染色效果,0.5% TTC,35℃,染色1~2 h,三七种子着色率高,颜色鲜红,便于观察,宜作为三七种子生活力检测的染色条件。

表1 三七种子不同千粒重测定方法比较

不同 试样	百粒法			五百粒法			千粒法		
	百粒重 (g)	标准差 (g)	变异系数 (%)	五百粒重 (g)	标准差 (g)	变异系数 (%)	千粒重 (g)	标准差 (g)	变异系数 (%)
试样1	7.52	0.27	3.55	37.04	0.97	2.61	73.55	0.80	1.08
试样2	7.47	0.22	2.97	36.95	0.78	2.11	73.32	2.26	3.08
试样3	7.41	0.29	3.88	34.99	0.98	2.80	74.49	1.28	1.71
试样4	7.36	0.18	2.43	37.35	0.54	1.45	74.18	1.03	1.39
平均值	7.44	0.24	3.20	36.58	0.82	2.24	73.88	1.34	1.82

3.6.2 有无生活力鉴定标准的确定

有活力的三七种子被TTC染为鲜红色,染色均匀。符合下列任意情况的即为有生活力的种子:(1)胚及胚乳完全着鲜红色;(2)胚全部着鲜红色,胚乳浅红色。无生活力的种子染色情况:(1)胚及胚乳完全不着色(或是着粉白色);(2)胚或胚乳不着色(或粉白色)。

3.7 发芽率测定

3.7.1 三七种子发芽前的抑菌处理

由表4可见,使用杀菌剂的处理组发芽率明显高出对照组,表明发芽前使用杀菌剂对三七种子进行表面消毒,可明显抑制霉菌污染,提高正常幼苗的发育率和计数的便利性。高锰酸钾、次氯酸钠为实验室常备药品,百菌清农业上常使用,实验室不常见。因此,三七种子发芽前抑菌处理方法为:0.1%或0.2%高锰酸钾或1%次氯酸钠浸种10 min均可。

3.7.2 适宜发芽床的确定

由表5可见,纸上、纸间和砂中3个处理组的发芽率无显著差异,均可作为三七种子的发芽床。纸上和纸间采用的是滤纸,取材方便,且易于观察种子萌发状况,其中纸上操作更简便,因此,选择纸上作为三七种子最适宜的发芽床。

3.7.3 适宜发芽温度的确定

由表6可见,三七种子在5~15℃的温度范围内发芽率显著高于其他温度处理组;随着温度的上升,其发芽率逐步下降,至35℃时,降为0。其中,恒温5℃和10℃处理组的萌发率最高,达90%,但是5℃低温

表3 TTC法测定三七种子生活力(%)

时间 (h)	0.1% TTC			0.5% TTC			1.0% TTC			1.5% TTC		
	30℃	35℃	40℃	30℃	35℃	40℃	30℃	35℃	40℃	30℃	35℃	40℃
1	0 a	0 a	0 a	67 a	100 a	100 a	100 b	100 c	50 b	100 c	75 c	100 c
2	20 b	66 b	75 b	100 b	100 a	100 a	75 a	75 b	50 b	80 b	50 b	75 b
3	67 c	100 c	100 c	100 b	100 a	100 a	100 b	67 b	25 a	75 b	0 a	0 a
4	75 d	100 c	100 c	67 a	100 a	100 a	75 a	25 a	25 a	25 a	0 a	0 a

注:生活力为4个重复的平均数。

下种子萌发速率较慢,周期长。因此,选择 10℃作为三七种子最适宜的萌发温度。

3.7.4 光照对发芽的影响

由表 7 可见,光照和黑暗处理对三七种子的发芽率无显著影响,说明三七种子对光反应不敏感。但是黑暗发芽的幼苗生长缓慢、纤弱;在实验室内检验时,不同季节自然光照不一,会对发芽结果产生一定影响。从标准化角度出发,每天给予固定光照的条件更合适,且便于鉴定黄化或白化的畸形苗。

表 4 不同杀菌剂抑菌效果

抑菌处理	发现污染时间 (d)	试验结束可计数的发芽率 (%)
自来水(ck)	13	84 a
无菌水	17	86 a
0.1% 高锰酸钾	17	96 b
0.2% 高锰酸钾	15	93 b
1% 次氯酸钠	15	94 b
1% 百菌清	13	92 b

注:发芽率为 4 个重复的平均数。

表 5 不同发芽床对三七种子发芽率的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

发芽床	发芽率(%)
纸上	90.00 ± 2.83 a
纸间	91.00 ± 2.00 a
砂中	92.50 ± 1.00 a

表 6 不同发芽温度下三七种子发芽情况比较($\bar{x} \pm s, n = 4$)

变温 (℃/℃)	发芽率 (%)	恒温 (℃)	发芽率 (%)
35/25	0 f	25	26.00 ± 10.20 d
30/20	21.00 ± 14.38 d	20	57.00 ± 9.59 c
25/15	26.00 ± 26.58 d	15	79.00 ± 4.16 ab
20/10	71.00 ± 4.24 bce	10	90.00 ± 2.83 a
15/6	83.00 ± 9.59 ae	5	89.50 ± 1.00 a

表 7 光照对三七种子发芽情况的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

处理	发芽率(%)
光照	89.33 ± 5.32 a
黑暗	86.33 ± 6.25 a

3.7.5 发芽计数时间的确定

通过休眠期的三七种子置发芽床后第 15 天胚根突破种皮约 2 mm,以后种子逐渐萌发,第 45 天后发芽速率明显下降,60 d 后,发芽基本结束,见图 1。因此,整个发芽计数时间在第 15~60 天。第 15 天为初次计数时间,第 60 天可作末次计数时间。

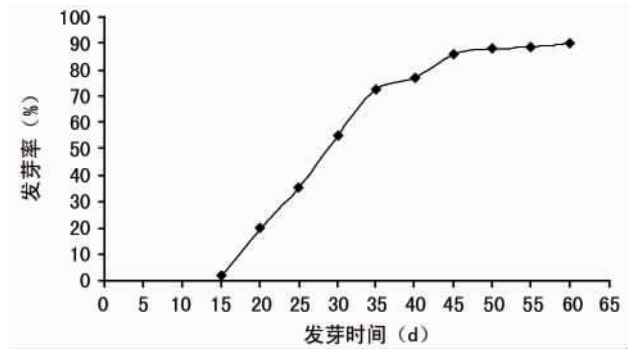


图 1 纸上、10℃、光照条件下三七种子发芽率与发芽时间的关系

4 结论与讨论

不同产地三七种子的质量存在一定差异,在制定质量检验规程时需考虑种子材料的代表性。本试验用种取自三七地理标志产地云南省文山州不同产地的三七种子共计 51 个批次,能较好地代表药材生产上三七用种的质量。

三七种子在自然状态下的寿命仅为 15 d 左右^[1],市场交易物为果实,需洗净阴干后方可播种。本研究中三七种子是收集的果实洗净后所得,净度均为 100%,因此,质量检验规程中不考虑净度分析。

有生活力的种子失水速度较死种子的失水速度慢,进行含水量测定前,需先测定所选用材料的发芽率^[3]。本试验所收集三七种子均为新鲜种子,发芽率较高,因此,其烘干所需时间具有普遍性。

由于自由水易受外界环境条件的影响,因此,各供试材料洗去果皮阴干后应立即进行含水量测定。根据试验材料的不同,种子水分测定有整粒法和磨碎法 2 种^[4]。三七种子为中小粒种子、种皮薄、透水性好。因此,采用整粒种子即可,无需粉碎。

在进行三七种子生活力快速检测时,也尝试应用红墨水法。试验结果发现,新鲜有活力的种子和通过高温煮沸法杀死的死种子均可着色,不能准确反映种子的生活力状况。因此,四唑法仍是比较理想的三七种子生活力检测方法。

三七种子发芽缓慢,即使在最适宜的发芽条件下,发芽周期亦长达 60 d,为发芽率的测定带来不便,因此,种子检验时可采用 TTC 法快速测定生活力,获得种子发芽的潜在能力。

本研究从扦样、净度分析、真实性鉴定、千粒重、含水量、生活力及发芽率 7 方面对三七种子质量检验方法进行了研究,制定了适宜三七种子的质量检验规程,见表 8。依据此规程对 51 批次不同种源的三七种子

(下转第 126 页)

人员要求) 脱粒、分晒, 分别装袋挂牌。在天气不利收晒时, 对刚脱粒回家的种子要将其在家中较宽的地方摊开, 以防种子发热、发霉影响种子芽率。

2.5.2 单独储藏、严格收种取样: 收种中的质量重点在于收种时间的安排、取样工作的重视以及对发现质量问题的处理方式。为预防人为和非人为质量混杂, 收种应该在白天进行, 同时加强取样工作力度, 要求制种户将种子全部倒入指定地方, 并由责任心强的扦样人员按照扦样标准取出有代表性的样品备鉴定之用。

2.5.3 完善样品种子鉴定管理: 种子的鉴定是对制种农户的种子质量进行正确判断的方法, 质检人员及时准确地搞好鉴定工作, 公司按照准确的鉴定结果对基地干部和制种户进行奖励或处罚。提高基地干群的质量意识, 有力促进制种质量管理。

种子质量在很大程度上依赖于生产过程质量, 生产过程是形成种子质量的关键环节。综上所述: 选择、培养、完善制种基地建设是提高制种种子质量的先决条件。同时加强田间管理, 扶壮父本加大花粉量, 提高父本花粉量与异源花粉量的比例, 通过施肥、打薹调节

父本花期, 使母本花期完全在父本花期的包容之下, 是提高制种种子质量和产量的关键措施; 加强组织管理, 及时彻底拔除制种田中的可育株, 是提高制种种子质量的决定因素; 规范收割程序、及时收晒、单独储藏、严格收种取样是预防人为和非人为质量混杂的有效措施。

参考文献:

- [1] 侯燕, 代传学. 甘蓝型隐性核不育杂交油菜制种配套栽培技术研究 V 父本花期调节技术研究 [J]. 种子, 1998, 17(增刊): 36-38.
- [2] 侯国佐, 代传学. 甘蓝型隐性核不育杂交油菜制种配套栽培技术研究 I 父本不同播种期的比较 [J]. 种子, 1998, 17(增刊): 24-26.
- [3] 范连益. 制种纯度的主要影响因素及其解决途径 [J]. 湖南农业科学, 2002(2): 8-10, 11.
- [4] 胡腾文, 李正强. 油研 10 号大面积制种 F_1 代不育株率和异型株率控制技术 [J]. 贵州农业科学, 2006(6): 106-105.

(上接第 122 页)

质量进行了检验, 方法稳定, 结果可信, 证明此规程适用于三七种子的生产、经营、管理和使用各方在种子生产采收、调运、播种、贮藏以及国内外贸易时所进行的种子质量检验。这将为三七种子质量分级标准和综合评价的研究提供依据和参考, 也将为保障三七药材的产量与质量奠定基础。

表 8 三七种子质量检验规程

检测项目	检验方法
扦样	四分法徒手扦样, 种子批的最大质量为 5 000 kg, 送验样品最少为 2 500 g
真实性	外观形态比较
重量	百粒法测定千粒重
水分	低恒温(103 ± 2) °C, 烘干 6 h
生活力	沿胚纵切, 取半粒, 于 0.5% TTC 溶液中 35 °C 避光染色 1 ~ 2 h
发芽试验	发芽前 0.1% 或 0.2% 高锰酸钾或 1% 次氯酸钠浸种 10 min, 发芽床为纸上, 10 °C 光照培养, 计数时间为第 15 ~ 60 天

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典. 一部 [S]. 2005.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第 54 卷). 被子植物门双子叶植物纲五加科 [M]. 北京: 科学出版

社, 1978.

- [3] 王淑琴, 于洪军, 官廷荆. 中国三七 [M]. 昆明: 云南民族出版社, 1993.
- [4] 郑光植, 杨崇仁. 三七生物学及其应用 [M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [5] 张子龙, 王文全, 王勇, 等. 连作对三七种子萌发及种苗生长的影响 [J]. 生态杂志, 2010, 29(8): 1 493-1 497.
- [6] 崔秀明, 王朝梁, 贺承福, 等. 三七种苗生物学特性研究 [J]. 中药材, 1993, 21(2): 60-61.
- [7] 安娜. 三七果实发育和种子后熟特性研究 [D]. 云南农业大学硕士学位论文, 2006.
- [8] 杨红玉. 三七生长生理及栽培研究的现状与方向 [J]. 中医药学报, 2000(4): 37.
- [9] 于福来, 王文全, 方玉强, 等. 甘草种子质量检验方法研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 746.
- [10] 江洁, 陈跃. 三七研究进展概述 [J]. 云南农业科技, 1998(5): 8.
- [11] 崔秀明, 王朝梁, 李伟, 等. 三七种子生物学特性研究 [J]. 中药材, 1993, 16(12): 3.
- [12] 崔秀明, 王朝梁, 李伟, 等. 植物激素及生长调节剂对三七种子的效应 [J]. 中药材, 1994, 17(2): 3.
- [13] 颜启传. 种子学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [14] 国际种子检验协会(ISTA). 1996 国际种子检验规程 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [15] 李淑娴, 吴雷, 李运红, 等. 低恒温烘干法测定种子含水量条件的研究 [J]. 种子, 2011, 30(5): 72-74.