广州相思子和毛相思子种子活力 TTC 测定方法研究

韩春艳[1]，孙卫邦[1]，董青松[2]，欧　彪[3]

(1. 中国科学院昆明植物研究所昆明植物园，云南 昆明 650204；2. 广西药用植物园，南宁 530023；3. 广西玉林制药有限责任公司，广西 玉林 537001)

摘要:通过对广州相思子(*Abrus cantoniensis* Hance)和毛相思子(*Abrus mollis* Hance)种子在 4 种 TTC 溶液浓度、3 种预湿方法、3 个染色温度下进行活力测定的研究,确定了广州相思子和毛相思子种子 TTC 法活力测定的最佳条件。研究结果表明,种子在 30 ℃恒温下水浸种 5 ~ 6 h,或纸间浸湿 12 h,种子充分吸胀后剥去种皮,置于 1.0% TTC 溶液中,在 30 ℃恒温暗光条件下染色 5 ~ 6 h,观察表面,以全染为正常鲜红色(或毛相思子允许染色略淡的红色)为有生活力的种子。

关键词: 广州相思子; 毛相思子; TTC; 活力测定

中图分类号: S 330.2　　**文献标志码**: A　　**文章编号**: 1001 - 4705(2011)07-0013-04

Study on Testing Seed Viability of *Abrus cantoniensis* and *Abrus mollis* with TTC Method

HAN Chun-yan[1], SUN Wei-bang[1], DONG Qing-song[2], OU Biao[3]

(1. Kunming Botanical Garden, Kunming Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;
2. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China;
3. Guangxi Yulin Pharmaceutical Co. Ltd, Yulin 537001, China)

Abstract: The seed viability of *Abrus cantoniensis* Hance and *Abrus mollis* Hance in four TTC solutions at three temperature levels with three wetting methods were tested. And the optimum conditions for testing seed viability of *A. cantoniensis* and *A. mollis* with TTC solution were determined. The seeds should be dipped into water at 30 ℃ for 5 - 6 h or placed in moist papers for 12 h. The imbibed seeds should be decorticated, and then placed in 1.0% TTC solution at 30 ℃ in darkness for 5 - 6 h, and the viable seeds could be dyed into normal bright red (or light red of *A. mollis* seeds).

Key words: *Abrus cantoniensis* Hance; *Abrus mollis* Hance; TTC; viability test

广州相思子(*Abrus cantoniensis* Hance)和毛相思子(*Abrus mollis* Hance)为豆科相思子属植物,多年生攀援灌木,匍匐或呈缠绕状[1]。广州相思子和毛相思子又名鸡骨草和毛鸡骨草,为广西地产大宗药材鸡骨草的原植物,是广西著名中成药"鸡骨草丸"系列产品的主要原料[2,3],具有清热解毒,舒肝止痛之功效,主要用于黄疸、胁肋不舒、治疗急、慢性肝炎[2]。在药材生产上,广州相思子和毛相思子主要以种子进行繁殖,但其种子不耐贮藏[3]。而种子的生产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,影响种子的活力也造成了药材产量和品质的不均[3]。因此,快速检测广州相思子和毛相思子种子的活力,可避免在生产上使用活力低的陈种子,造成生产上的损失。

种子活力是指种子发芽的潜在能力或种胚具有的生活能力,它是检验种子质量高低的一项最可靠指标[4,5]。测定种子活力的方法很多,目前 TTC(Triphenyl Tetrazolium Chloride)染色法作为种子生活力鉴定的标准方法,已得到广泛应用[4,5]。TTC 染色法是根据种子生化代谢的强弱,经脱氢还原反应,显现差异性红色特征,通过判断种子胚和主要结构组织染色状况来判断种子生活力。TTC 染色法具有原理可靠、结果

收稿日期:2011 - 03 - 01
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"(2009 ZX 09308-002);广西科技攻关计划项目(桂科攻 0992003 B-38)。
作者简介:韩春艳(1979 -),女,博士,助理研究员;主要从事种子生物学和保护生物学方面的研究。
通讯作者:董青松,E-mail:ddqqss@ yahoo. com. cn。

准确、不受种子休眠限制、方法简便、节时快速的特点，一般可在6~24 h获得测定结果[4~9]。经世界许多种子科学家用标准发芽与TTC测定的对比试验表明，TTC染色结果与标准发芽率一般很接近，TTC测定是最有希望代替发芽试验的方法。

目前，对广州相思子和毛相思子种子活力的快速检测尚缺乏TTC染色的详细资料，因此，本研究对在不同条件下广州相思子和毛相思子TTC染色的效果进行了探索，希望找出一个最佳的活力测定条件，为其种质鉴定、种子检验、种子生产提供依据，从而保障药材生产和用药企业的可持续发展，保障人们用药的安全有效。

1 材 料

实验材料为2004年新鲜成熟的广州相思子和毛相思子种子，广州相思子采自广西贵港市东津镇狮夏村，毛相思子采自广西玉林樟木镇塘基村。收集到的种子进行扦样后，以纸袋或布袋包装，置于室内干燥、阴凉处于室温下保存。

2 方 法

2.1 氯化三苯基四氮唑(TTC)缓冲溶液的配制

在1 000 ml水中溶解9.078 g KH_2PO_4，得溶液Ⅰ；在1 000 ml水中溶解23.893 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$，得溶液Ⅱ。取2份溶液Ⅰ和3份溶液Ⅱ混合，并核查pH值，使其值保持在6.5~7.5的范围内。

在缓冲溶液里溶入准确数量的TTC，例如每100 ml缓冲溶液中溶入1.0 g四唑盐类即得1.0%浓度的溶液。分别配置0.1%、0.5%、1.0%及1.5%的TTC溶液。

2.2 种子预湿

随机数取精白机磨过的种子100粒，5个重复，将其置于(1)湿润纸上(TP)，(2)湿润纸间(BP)，(3)水中浸渍(W)；然后分别置于20、25、30、35 ℃培养箱中，每1 h观察种子吸胀情况，在较多数种子已吸胀的后期，每次观察时取50粒种子，以解剖刀和镊子切割种子和剥离种皮，根据种皮的软化程度和解剖的难易程度来确定最适的预湿方法与时间。

2.3 染色前的准备

随机数取预湿后的种子500粒，分别进行以下处理：(1)整粒；(2)离胚根远端横切2/5；(3)剥皮：剥去种皮使子叶及胚充分暴露。将处理后的种子置于1.0%TTC溶液中，以浸没为度，培养皿用黑色纸袋套装，置于30 ℃暗光下进行染色，每1 h随机取出部分种子，用清水冲洗，观察染色情况。

2.4 染 色

随机数取预湿后的种子100粒，4个重复，剥去种皮，置于大小合适的培养皿中，倒入配置好的染色液，以浸没为度，置于相应温度的烘箱中暗光进行染色反应。到时取出，倒去染色液，用清水冲洗，观察，计数。染色液浓度为0.1%、0.5%、1.0%、1.5%，反应温度设30、35、40 ℃，反应时间30 ℃设3~7 h，35 ℃和40 ℃设1~5 h，每小时观察1次。

2.5 染色图谱鉴定

随机数取净种子100粒，4个重复，预湿后剥皮取离体胚，置于湿润滤纸上在30 ℃条件下进行发芽试验。试验结束时观察、计数，与30 ℃下种子染色反应的结果进行对比分析，数据的差异性分析用DPS数据处理系统。

3 结果与分析

3.1 预湿方法和时间

各预湿方法达到充分吸胀的最短时间如表1。表1结果表明，TP和BP种子吸胀的时间没有差异，但水中浸渍比缓慢预湿提前很多，并且未出现组织破裂损伤的情况。在30 ℃和35 ℃下，种子预湿效果好，时间短，但根据种子发芽特性，以及同时与其他试验对照，故在TTC试验中，选择在30 ℃水中浸渍作为预湿方式。

表1 广州相思子(Ac)和毛相思子(Am)预湿最短时间

预湿温度	20 ℃		25 ℃		30 ℃		35 ℃		种子状况
预湿方法	Ac	Am	Ac	Am	Ac	Am	Ac	Am	
	预湿时间(h)								
湿润纸上(TP)	24	30	10	12	10	10	8	8	充分吸胀的种子，种皮
湿润纸间(BP)	24	30	10	12	10	10	8	8	软化，很容易将种皮与
水中浸渍(W)	7	8	6	7	5	6	4	4	胚剥离，也易将种子切开。

3.2 染色前的准备

染色前的不同处理结果如表2。从表2可看出，种皮妨碍染色液的吸收，不论是整粒还是部分切去种子，其染色时间长，染色不完全；而剥皮的胚染色快，染色均匀，便于观察。因此，染色前的准备为将预湿好的种子进行剥皮。

3.3 染 色

不同染色液浓度、染色温度及染色时间的染色结果见表3，染色结果与发芽试验结果见表4。从表3、4结果看，0.1%的TTC液浓度低，染色效果差；1.5%的浓度过高，易出现过度染色。1.0%~1.5% TTC液30 ℃染色4~6 h、0.5%~1.0% TTC液35 ℃染色4 h、1.0% TTC液40 ℃染色2 h均有较好的染色效果。

表 2　广州相思子和毛相思子染色前处理结果

处理方式	广州相思子	毛相思子
整粒种子	10 h:个别粒根尖或子叶边缘有染色反应;	10 h:个别粒根尖或子叶边缘有染色反应;
	14 h:染色加深,个别有生活力粒呈橙红——鲜红色;	14 h:染色加深,个别有生活力粒呈橙红——鲜红色;
	18 h:较多有生活力粒呈橙红——鲜红色,但局部染色粒较模糊,全染粒占 14%,染色粒占 40%;	18 h:较多有生活力粒呈粉红、橙红——鲜红色,但局部染色粒较模糊,全染粒占 23%,染色粒占 73%;
	22 h:染色较透,染色粒较 18h 有较大幅度增加,全染粒占 34%,染色粒占 65%。	22 h:染色较透,染色粒较 18 h 有较大幅度增加,全染粒占 23%,染色粒占 72%。
	24 h:有染色呈暗红的粒,全染粒占 35%,染色粒占 88%。	24 h:有染色呈暗红的粒,全染粒占 40%,染色粒占 80%。
横切	3 h:有生活力的种子子叶切面可见有染色反应,呈淡红色;	3 h:有生活力的种子子叶切面可见有染色反应,呈淡红色;
	24 h:有生活力的种子在切口处鲜——暗红,但剥开种皮观察发现种子染色不均匀,切口远端染色、未染色或染色浅。	24 h:有生活力的种子在切口处鲜——暗红,但剥开种皮观察发现种子染色不均匀,切口远端染色、未染色或染色浅。
剥皮	1 h:可观察到染色反应,胚根或子叶边缘先染色;	1 h:可观察到染色反应,胚根或子叶边缘先染色;
	2 h:染色加深,但多粒有活性的颜色仍呈淡红,未达到鲜红;	2 h:染色加深,但多粒有活性的颜色仍呈淡红,未达到鲜红;
	3 h:可见较多有活力粒颜色染得鲜红,但仍有较多粒呈淡红状态,且局部染色粒仍较多呈不清晰状态,不好下鉴定结论;	3 h:可见较多有活力粒颜色染得鲜红,但仍有较多粒呈淡红状态,且局部染色粒仍较多呈不清晰状态,不好下鉴定结论;
	4 h:可见有生活力粒染色清晰,鲜红;全染粒占 14%,染色粒占 30%;	4 h:可见有生活力粒染色清晰,鲜红;全染粒占 14%,染色粒占 45%;
	5 h:可见有生活力粒染色清晰,鲜红,局部染色粒染色状态也较稳定;全染粒占 14%,染色粒占 37%;	5 h:可见有生活力粒染色清晰,鲜红,局部染色粒染色状态也较稳定;全染粒占 18%,染色粒占 48%;
	6 h:可见部分的有生活力粒染色过红变暗;全染粒占 17%,染色粒占 44%。	6 h:可见部分的有生活力粒染色过红变暗;全染粒占 21%,染色粒占 50%。

注:全染粒指整粒种子全染成可鉴定的红色。下表同。

表 3　广州相思子(Ac)和毛相思子(Am)染色试验结果

染色液浓度	30 ℃		35 ℃		40 ℃	
	Ac	Am	Ac	Am	Ac	Am
0.1%	着色不均匀,试验结束时的全染粒一半鲜红一半淡红的现象较多。	着色不均匀,试验结束时的全染粒一半红一半粉红的现象较多。	全染粒染色较好,但局部染色粒不清晰。	全染粒染色较好,但局部染色粒不清晰。	染色 2 h 的全染粒染色较清晰、均匀,但局部染色粒不清晰。	染色 2 h 的全染粒染色较清晰、均匀,但局部染色粒不清晰。
0.5%	全染粒着色较好,但局部染色粒染色不够清晰,难于鉴定。	全染粒着色较好,但局部染色粒染色不够清晰,难于鉴定。	染色 4 h 的染色清晰、均匀,可鉴定。	染色 4h 的染色清晰、均匀,可鉴定。	染色 2 h 的全染粒染色较清晰、均匀,但局部染色粒不清晰。	染色 2 h 的全染粒染色较清晰、均匀,但局部染色粒不清晰。
1.0%	染色 5 ~ 6 h 的染色清晰、均匀,可鉴定。	染色 5 ~ 6 h 的染色清晰、均匀,可鉴定。	染色 4 h 的染色清晰、均匀,可鉴定。	染色 4 h 的染色清晰、均匀,可鉴定。	染色 2 h 的染色较清晰、均匀,可鉴定。	染色 2 h 的染色较清晰、均匀,可鉴定。
1.5%	染色 4 ~ 5 h 的染色清晰、均匀,可鉴定。	染色 4 ~ 5 h 的染色清晰、均匀,可鉴定。	全染粒染色较好,但局部染色粒不清晰。	全染粒染色较好,但局部染色粒不清晰。	染色 2 h 的全染粒染色较清晰、均匀,但局部染色粒不清晰。	染色 2 h 的全染粒染色较清晰、均匀,但局部染色粒不清晰。

染色时,有生活力种子染成有光泽的鲜红色,染色均匀,局部染色粒染色清晰,便于观察鉴定。根据表 4 可以看出,1.0% TTC 溶液 30 ℃染色 5 ~ 6 h 的处理与种子发芽试验结果的差异最小,从染色效果、染色时间、材料节省及环境污染(四唑有毒)的角度出发,四唑染色选择 1.0% TTC 液 30 ℃染色 5 ~ 6 h 较为适宜。但通过表 4 的试验结果发现,所测得的种子生活力值均高于实际发芽率。因此,TTC 活力测定值只能用于估测种子的潜在发芽能力,而不能完全取代发芽试验。

表 4　广州相思子和毛相思子染色结果与发芽试验结果对比分析

种名	染色方法	全染率(%)	发芽率(%)	$P_{0.05}$
广州相思子	30 ℃ 1.0%	16	17	b
	35 ℃ 0.5%	30	—	a
	35 ℃ 1.0%	33	—	a
毛相思子	30 ℃ 1.0%	46	45	b
	35 ℃ 0.5%	56	—	a
	35 ℃ 1.0%	53	—	a

注:表内差异性分析是全染率与种子在 30 ℃下的发芽率对比分析的结果。

3.4 染色图谱的鉴定

广州相思子和毛相思子四唑测定与离体胚发芽结果比较见表5。离体胚发芽试验中,可以看到完整的胚若是发芽,长成的幼苗也是完整的。有些完整胚即使是新鲜的,但也不能发芽。个别有破损的种子不能发芽,相应的在活力染色中,这部分种子不着色或部分不着色。从表5的发芽情况和四唑染色情况比较,有生活力种子的胚全部染色,局部染色和不染色的为无生活力种子。

4 讨 论

广州相思子和毛相思子种子的种皮坚硬,必须经打磨或浓硫酸腐蚀后,方可进行预湿,试验结果发现,种子在30 ℃恒温水浸渍5~6 h,或在湿润纸间12 h预湿效果均较好;且剥皮的种胚染色快,染色均匀,便于观察。因此,染色前需将预湿好的种子进行剥皮。

由研究可知,种子预处理的方式、TTC溶液的浓度、染色温度以及染色时间对于种子活力测定的结果均有一定的影响。在一定温度范围内,四唑溶液浓度越高,染色温度越高,所需染色时间越短。

由以上实验可知,TTC溶液浓度低,染色效果差,而1.5%浓度过高,易出现过度染色。根据《1993国际种子检验规程》的规定,林木种子TTC染色浓度不宜超过1.0%[10]。而此时,活力染色结果与种子发芽结果误差最小,因此,广州相思子和毛相思子TTC溶液浓度以1.0%为佳,且在30 ℃下染色5~6 h染色效果最好。广州相思子和毛相思子的TTC活力测定染色时,有生活力种子染成有光泽的鲜红色,染色均匀,局部染色粒染色清晰,便于观察鉴定;但毛相思子整粒种子可染成略淡的颜色。

表5 广州相思子与毛相思子TTC染色与离体胚发芽试验结果

种名	种子发芽情况			种子四唑染色情况	
	离体胚	发芽率(%)	未发芽率(%)	四唑染色状态	染色率(%)
广	完整且新鲜	17	48	完全染色	16
州	仅胚根破损	0	3	仅子叶不染色	7
相	子叶远胚根处或侧边<1/3破损	0	0	仅胚根不染色	7
思	子叶远胚根处或侧边≥1/3破损	0	0	子叶远胚根处或侧边<1/3不染色	9
子	胚根及部分子叶破损	0	1	胚根及部分子叶不染色	16
	组织腐烂	0	31	完全不染色	45
毛	完整且新鲜	45	23	完全染成鲜红色	46
相	仅胚根破损	0	4	仅子叶不染色	2
思	子叶远胚根处或侧边<1/3破损	0	0	仅胚根不染色	3
子	子叶远胚根处或侧边>1/3破损	0	0	子叶远胚根处或侧边<1/3不染色	2
	胚根及部分子叶破损	0	2	胚根及部分子叶不染色	8
	组织腐烂		26	完全不染色	39

注:表内数据为4个重复的平均数。

参考文献:

[1]中国科学院中国植物志辑编委会.中国植物志[M].第四十卷.北京:科学出版社,1994.

[2]李爱媛,周芳,陈坤凤,等.鸡骨草与毛鸡骨草及其种子的急性毒性实验[J].时珍国医国药,2008,19(7):1 720-1 721.

[3]董青松,颜钟亚,白隆华,等.鸡骨草种子发芽试验条件的研究[J].种子,2006,25(2):81-84.

[4]颜启传,黄亚军.种子四唑测定手册[M].上海:上海科技出版社,1992.

[5]金小马,陈惠,张志飞.多年生黑麦草种子活力TTC测定方法研究[J].作物研究,2008,22(1):45-46.

[6]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.

[7]陈婧.小麦种子生活力与发芽率的相关性分析[J].种子科技,2002(5):287-289.

[8]刘继永,王英平,孔祥义,等.南星种子生活力和发芽率的测定[J].特产野生经济动植物研究,2004(1):25-26.

[9]盛海平,刘华开,孙树坤.水稻种子生活力与发芽率间的相关模式及应用[J].安徽农业科学,2000.

[10]李家义,支巨振,黄亚军,等.1996国际种子检验规程[S].北京:中国农业出版社,1999.