



四唑染色法测定毛竹种子生活力的研究*

蔡春菊 彭镇华 高志民 高健 李雪平

(国际竹藤网络中心 国家林业局竹藤科学与技术重点实验室 北京 100102)

摘要:采用染色全过程观察和正交试验方法研究了 TTC 浓度、温度和染色时间对毛竹种子生活力的影响,探讨毛竹种子生活力测定的最佳条件。结果表明:四唑染色法能够很好地检测毛竹种子生活力水平,估测种子的潜在发芽能力。TTC 浓度、温度和染色时间在生活力测定中存在一定的线性关系。试验表明,25℃下浸种 48 h 待种子完全吸涨后,于 30~35℃黑暗条件下、TTC 浓度 0.5%,染色 3~4 h 为毛竹种子生活力测定的最佳条件。

关键词:毛竹种子;生活力;四唑测定技术

Study on Moso Seed Viability by TTC Testing Method

Cai Chunju; Peng Zhenhua; Gao Zhimin; Gao Jian; Li Xueping

(International Center for Bamboo and Rattan, Key Laboratory

of Science and Technology of Bamboo and Rattan,

State Forestry Administration, Beijing 100102)

Abstract: To find the optimum conditions for testing seed viabilities of *Phyllostachys edulis*, TTC concentration, dyeing temperature and dyeing time were tested by dyeing process observation and orthogonal design (four levels in each of three factors). The results showed that TTC methods could test seed viability level effectively and appraise potential germination ability of *Phyllostachys edulis*. There existed linear relationship among solution concentration, dyeing temperature and dyeing time. This paper proposed that after full imbibition treatment by dipping in water for 48 hours at 25℃, 0.5% of TTC concentration, 30~35℃ of temperature and 3~4 h of dyeing time in darkness could be the best condition for *Phyllostachys edulis* seed viability testing.

Key Words: seed; *Phyllostachys edulis*; viability; TTC testing method

毛竹 (*Phyllostachys edulis*), 隶属禾本科、竹亚科、刚竹属,为我国分布最广、面积最大、经济价值最高的竹种之一。营造毛竹竹林对优质种苗的需求与日俱增,常规的分株、压条、埋杆、埋鞭等育苗已经不能满足需求,采用种子育苗逐渐成为现代毛竹造林的主要途径之一。种子育苗造林适应性强、成苗率和成活率高,更重要的是,实生苗圃一旦建立将成为“终身苗圃”。种子质量的优劣直接影响实生苗成活率和造林成效的高低,开展毛竹种子质量检验显得非常重要。

通常毛竹种子发芽迟缓,即使在适宜的温度条件下,也要延续 30 天左右^[2]。常规的发芽试验方法远远不能满足实际种子质量检验和调拨的需要。如何采用准确可靠的快速方法测定毛竹种子生活力是亟待解决的实际问题。生活力的四唑 (2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride, 缩写 TTC) 测定技术^[2-4]是通过鉴定种子内部活组织的染色情况,确定种子生活力的快速、有效、准确的质量检验方法,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,应用范围广泛。本研究旨在探讨应用四唑测定技术测定毛竹种子生活力的适宜条件,提出毛竹种子的生活力快速测定的方法,为提高毛竹育苗质量提供可靠参考。

* 基金项目:国家“十一五”科技支撑项目 (2006BAD19B202 和 2006BAD19B0203) 和国际竹藤网络中心基本科研业务费专项资金 (06/07-B12) 资助。

作者简介:蔡春菊 (1975-),女,山东青州人,博士,助理研究员,主要研究方向为竹藤遗传育种。



1 材料与方法

1.1 材料

毛竹种子源自广西省临桂县林业局, 2006年9月份采收, 通风干燥后于4℃冰箱中塑料袋封存。种子净度为56.6% ± 0.31%, 千粒重为24.1 ± 0.53 g。处理时净种子平均含水量为8.26% ± 0.43%。

1.2 方法

1.2.1 染色进程观察

分别测定25℃、30℃、35℃、45℃温度下TTC浓度为1.0%、0.5%、0.2%、0.1%时种子随时间变化的染色反应过程。每个处理3次重复, 50粒/重复。

1.2.2 染色影响因子正交试验

根据TTC染色曲线的初步结果, 选用 $L_{16}(4^5)$ 因素4水平的正交表, 设计TTC生活力测定主要影响因子浓度、染色时间和反应温度的正交设计(见表1)。每个处理50粒种子, 3次重复。

参考国家标准GB2772—1999《林木种子检验规程》^[2]。用磷酸缓冲液(pH=7.0)配制不同浓度的TTC溶液。取完全吸涨后不同处理的毛竹净种子, 切开露胚, 带胚的一半种子加入TTC溶液, 以完全淹没种子为宜, 于恒温黑暗条件下染色。染色结束后用清水冲洗并在解剖镜下观察判断种子生活力^[6]。

种子生活力(%) = 胚被染色的种子数目 / 观察的种子总数 × 100。

表1 TTC生活力测定的正交表

试验	TTC浓度/%	反应温度/℃	染色时间/h
1	0.1	20	1
2	0.1	25	2
3	0.1	30	4
4	0.1	35	6
5	0.2	20	2
6	0.2	25	1
7	0.2	30	6
8	0.2	35	4
9	0.5	20	4
10	0.5	25	6
11	0.5	30	1
12	0.5	35	2
13	1.0	20	6
14	1.0	25	4
15	1.0	30	2
16	1.0	35	1

1.2.3 种子发芽与生活力测定

选择毛竹净种子放入预先稳定2 d、温度40℃、相对湿度为95%的恒温恒湿箱中进行老化处理, 分别于放入0 d, 2 d, 4 d, 6 d, 8 d, 10 d后取出, 自然干燥至含水率8.0%左右, 得到6种老化处理种子。取老化处理后的种子, 每个处理随机取净种子300粒, 去离子水25℃下浸泡48 h后分成数量相等的2份, 分别用于发芽实验和生活力测定(染色条件为TTC浓度0.5%、35℃、染色4 h), 验证毛竹种子发芽率和生活力的关系。每个处理3次重复, 50粒/重复。

双层滤纸发芽床, 25℃恒温生化培养箱内发芽。置床后以胚+下胚轴达到或超过种子长度为标准记录发芽数, 发芽结束后统计发芽率。

发芽率(G_t) = $\sum G_t / N_T \times 100\%$ 。其中, G_t 表示在t日时的发芽数, N_T 表示种子总数^[7]。

2 结果与分析

2.1 TTC浓度及温度对种子染色进程的影响

按照《国际种子检验规程》, 林木种子TTC染色浓度通常为0.1%~1.0%, 适宜的染色温度为20~45℃。在适宜的染色温度范围内选择25℃、30℃、35℃、45℃四种温度, 研究不同TTC浓度下毛竹种子染色进程(见图1)。

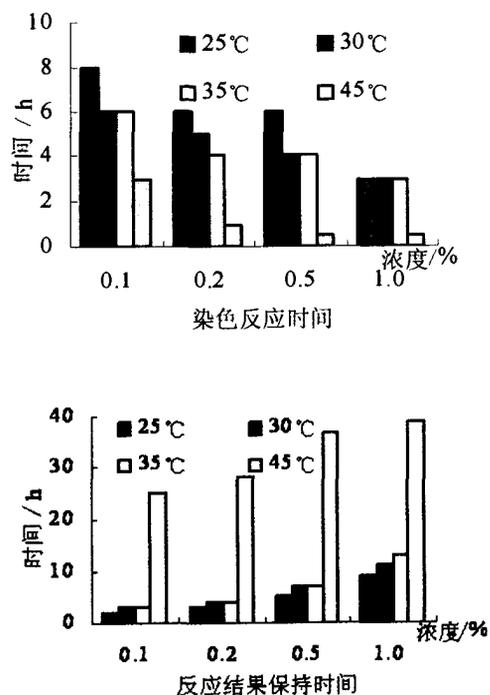


图1 TTC浓度及温度对种子染色进程的影响



结果表明: TTC 浓度越高, 染色反应速度越快, 所需时间越短, 结果越明显, 且染色结果保持的时间越长。TTC 浓度为 0.1%、0.2%、0.5% 和 1.0% 时, 平均染色时间为 3.9 h、2.7 h、2.5 h 和 1.8 h; 在 25~35℃ 下染色时, 染色结果分别能保持 2.7 h、3.7 h、6.3 h、11 h, 45℃ 时染色结果则能保持 25~39 h。温度也是种子生活力测定的重要影响因素之一。在同一浓度条件下, 温度越高, 染色所需时间越短, 染色结果保持时间也越长。25℃、30℃、35℃、45℃ 4 种温度下平均染色时间为 5.8 h、4.5 h、4.3 h 和 1.3 h, 染色结果分别能保持 4.3 h、6.3 h、6.8 h、32.3 h。

TTC 浓度、温度和时间三者 在染色反应过程中关系密切。在一定范围内, 可以通过改变其中的两个条件而达到改变第 3 个条件的目的。因此, 从生产实际出发, 可以通过增加反应温度和反应时间降低 TTC 浓度同样达到良好染色效果。试验中发现: 在 TTC 浓度 $\leq 0.2\%$ 时, 在 30~45℃ 下染色 4~6h 较为适宜, 温度较低(25℃), 染色时间长, 着色稳定时间短, 染色效果不理想; 当 TTC 浓度在 0.2%~1.0% 时, 在 30~35℃ 下染色 3~4 h 效果较好, 温度过高(45℃), 染色太快, 着色深, 也不利于染色结果的生活力准确判断。

2.2 生活力测定影响因素间的相互作用

根据染色进程的初步结果, 选用 $L_{16}(4^5)$ 3 因素 4 水平正交表, 设计 TTC 生活力测定主要影响因子浓度、染色时间和反应温度的正交试验, 结果见表 4, 对测定结果进行方差分析和回归分析结果见表 5, 表 6。

由表 4 直观的测定结果同样得出与上述相同的结论: TTC 浓度、染色温度越高及染色时间越长, 染色效果越好, 且改变其中的两个条件可以达到改变第 3 个条件的目的。

方差分析表明: 在适宜的温度和浓度范围内, 三因素对生活力均表现出极显著影响, 均为生活力测定的关键因素。其中, TTC 浓度、温度和时间三因素间对生活力影响作用表现出时间 > 温度 > TTC 浓度, 温度和 TTC 浓度的影响贡献率相差不大; 染色时间与生活力的相关系数略大, 成为生活力测定的主要限制因子。

这也说明适宜的染色时间在生活力测定中的重要性。

表 2 TTC 生活力测定

试验	浓度/%	温度/℃	时间/h	生活力/%
1	0.1	20	1	0
2	0.1	25	2	10
3	0.1	30	4	77
4	0.1	35	6	93
5	0.2	20	2	0
6	0.2	25	1	0
7	0.2	30	6	92
8	0.2	35	4	94
9	0.5	20	4	67
10	0.5	25	6	95
11	0.5	30	1	0
12	0.5	35	2	98
13	1.0	20	6	91
14	1.0	25	4	97
15	1.0	30	2	94
16	1.0	35	1	84

表 3 生活力方差分析

模型	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
生 回 归	23300.31	3	7766.77	24.06	<0.001
活 剩 余	3873.687	12	322.81		
力 总 和	27174.00	15			

用 SPSS11.0 统计软件进行方差分析和交互作用分析。结果表明: 在适宜的染色反应条件范围内, TTC 浓度、染色温度和染色时间与生活力间存在极显著的线性相关关系, 回归系数为 0.926。TTC 法测定方法简便、省时、快速和可操作性强, 是毛竹种子生活力的良好方法。生活力与三因素之间建立起的多元线性回归方程(见表 6)可以为毛竹种子生活力估测作参考。

2.3 毛竹种子发芽率与种子生活力的关系

老化处理后不同活力的毛竹种子进行生活力与发芽率测定结果表明: 老化处理后的毛竹种子发芽率(Y)与生活力(x)之间建立的线性方程为 $Y=1.909x-133.432$, 二者达到极显著相关($P<0.01$), 相关系数为 0.939。因此, TTC 法可以较好的检测毛竹种子生活力水平的高低。但 TTC 法得出的生活力均高于直接用发芽试验得出的发芽率水平。因此, 本研究中 TTC 法测定的生活力只能用于估测种子潜在的发芽能



表4 毛竹种子生活力与 TTC 浓度、温度 and 时间的回归分析

变 量	相关系数 coefficients			回归方程
	X_1 , 浓度	X_2 , 温度	X_3 , 时间	
constant				$Y_1 = 53.469x_1 + 3.47x_2 + 14.068x_3 - 103.207$ $R = 0.926 (P < 0.001)$
生活力	0.454	0.471	0.656	

力, 还不能完全取代发芽试验, 这与其他种子 TTC 法生活力测定结果一致^[8, 9]。

3 小结与讨论

(1) TTC 法检测种子活力, 原理可靠、方法简便、省时快速, 可较好的检测毛竹种子生活力水平的高低, 估测种子的潜在发芽能力。TTC 浓度、温度和时间三因素均为生活力测定的关键因素, 对生活力均表现出极显著影响, 在生活力测定中存在一定的线性关系, 可以通过改变其中的两者而达到改变第 3 条件的目的。在适宜的温度和浓度范围内, 染色时间成为生活力测定的主要限制因子, 控制好染色时间对毛竹种子生活力测定具有重要意义。

(2) 从节约成本和可操作性出发, 可通过降低 TTC 溶液浓度, 提高反应温度和延长染色时间达到良好的染色效果, 从而降低成本。生产上可根据实际需要, 在适宜的 TTC 浓度范围内选择低浓度 ($\leq 0.2\%$) 在 $30 \sim 45^\circ\text{C}$ 下染色 4~6 h 或较高浓度下 ($> 0.2\%$) 在 $30 \sim 35^\circ\text{C}$ 下染色 3~4 h 效果较好。建议选择浓度为 0.5%、温度为 $30 \sim 35^\circ\text{C}$ 、染色 3~4 h 作为毛竹种子生活力测定的最佳条件。

(3) 经世界许多种子科学家用标准发芽与四唑测定的对比试验表明^[4], 四唑测定结果与标准发芽率一般很接近, 四唑测定是最有希望代

替发芽试验的方法。但本研究及玉米等^[8]其他种子研究结果都表现出 TTC 法得出的生活力普遍高于发芽试验的结果, TTC 法还不能完全取代发芽试验。这一方面在于毛竹种子萌发还没有建立起标准的发芽方法, 另一方面毛竹种子生活力测定条件及结果判别方法也有待于进一步研究。因此, 需要深入研究毛种子萌发的生理特性, 以提高毛竹种子生活力测定结果判定的准确性, 从而为估测毛竹种子发芽率提供了一种快速、准确、简便和适用的新方法。

参考文献

- 1 江泽慧主编. 世界竹藤. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2002
- 2 中华人民共和国标准(GB2772-1999). 林木种子检验规程. 中国标准出版社, 2000, 4
- 3 国际种子检验规程. 国际种子检验协会(ISTA), 1999, 4
- 4 颜启传, 黄亚军. 种子四唑测定手册. 宁波市种子质检中心, 1992, 5
- 5 阎富英. 国内外种子生活力和活力测定技术的最新进展. 种子, 2005 (6), 24(6): 48~50
- 6 宋松泉, 程红焱, 龙春林, 等. 种子生物学研究指南. 北京: 科学出版社, 2005
- 7 郑光华. 种子生理研究. 北京: 科学出版社, 2004
- 8 戴铮. 玉米种子发芽率与生活力的相关性研究. 种子, 2004, 23(9): 68~69
- 9 喻方圆, 唐燕飞. 四唑法快速测定任豆种子生活力的研究. 种子, 2004, 23(7): 40~42

竹业信息

竹子将成为 21 世纪的建筑材

在资金匮乏和人口增多的年代, 社会效益和环保功效是竹子作为建筑材料热卖的主要理由。如印度尼西亚巴厘岛有一座长 50 m 的竹子桥梁, 其坚固度可承载卡车。1991 年, 在哥斯达黎加发生了里氏 7.7 级的地震, 大批砖瓦和钢筋混凝土建筑倒塌了, 但是 20 多座用竹子搭建的建筑却安然无恙, 甚至没有出现丝毫的裂缝。与钢铁不同的是, 只有少数国家具备生产钢

铁的能力, 但是却有超过 1100 多种竹子分布在热带地区。它可以减少有害气体排放所带来的影响, 同时可以像沙漠仙人掌一样有效地吸收水分。用竹子作为建筑材料需要大量的劳动力, 而对世界上某些国家而言使用竹子也有可能意味着成本过高, 这完全取决于当地竹子的产量。

——生活空间