

苦豆子种子发芽检验标准化研究[△]

卢有媛*,李金田,张延红,杜 骏,晋 玲[#](甘肃中医药大学药学院,兰州 730000)

中图分类号 R282.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)07-0995-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.07.40

摘要 目的:确定苦豆子种子发芽的最适宜条件,为制订苦豆子种子检验规程及标准化提供依据。方法:苦豆子种子以98%硫酸处理30 min+35℃温水浸泡29 h后,分别在不同温度(15、20、25、30℃)、不同发芽床(纸上、纸间、砂上、砂中)、不同光照(2 000 lx光照16 h、黑暗)条件下进行处理,以发芽率、发芽势和发芽指数为指标筛选最适宜发芽条件;并在此条件下培育种子7 d,测定其发芽率。结果:不同温度对苦豆子种子发芽率影响不大,但对发芽势和发芽指数有影响,以20℃时各指标值最高;不同发芽床对各指标均有影响,以砂上处理条件下各指标值最高;光处理对苦豆子种子发芽各指标影响不大。在适宜条件下培育,种子从置床第1天起就开始萌发,第2天发芽率达90%以上,至第5天达到最大并不再增长。结论:苦豆子种子发芽的适宜培育条件为以98%硫酸处理30 min+35℃温水浸泡29 h,在砂上20℃光照培养。在种子置床第2天初次计数,第4天末次计数并统计发芽率并结束试验,此方法可作为苦豆子种子质量检验的标准化方法。
关键词 苦豆子;种子;发芽温度;发芽床;光照条件;发芽动态;质量检验

Study on Standardization of Germination Test of *Sophora alopecuroides* Seed

LU Youyuan, LI Jintian, ZHANG Yanhong, DU Tao, JIN Ling (College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000)

ABSTRACT OBJECTIVE: To select the optimum conditions for germination test of *Sophora alopecuroides* seed, and to provide reference for formulating seed test rule and standardization of *S. alopecuroides*. METHODS: *S. alopecuroides* seeds were soaked in 98% H₂SO₄ for 30 min and 35℃ warm water for 29 h, and then treated under different temperature conditions (15℃, 20℃, 25℃ and 30℃), different germination beds (on paper, between paper, on sand, in sand) and different light conditions (2 000 lx lighting 16 h, dark). Optimal germination condition was screened by using germination rate, germinative potential and germinative index as indicators. *S. alopecuroides* seeds were cultured under this condition for 7 days, and then germination rate was determined. RESULTS: Different temperatures had no significant effect on germination rate, but influenced germinative potential and germinative index; those indicators reached maximal value at 20℃. Different germination beds affected each indicator, and under condition of on sand, those indicators were the highest. Light treatment had no significant effect on germination indicators. Under suitable condition, the seed sprouted since first day of germination bed treatment; germination rate was more than 90% on second day, and reached maximal value on fifth day and didn't increase any longer. CONCLUSIONS: The suitable condition of seed germination was soaking in 98% H₂SO₄ 30 min+35℃ warm water for 29 h, on sand under light at 20℃. Initial count on second day of germination bed treatment and final count on forth day were analyzed statistically as well as germination rate. This method can be used as standard quality test of the seed of *S. alopecuroides*.
KEYWORDS *Sophora alopecuroides*; Seed; Germination temperature; Germinating bed; Light condition; Germination dynamic; Quality test

苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)为豆科多年生草本植物^[1],具有清热解毒、祛风燥湿、止痛杀虫等作用^[2],为常用中草药。此外,苦豆子也是优良的固沙植物和可利用的牧草^[3]。近年来由于土地荒漠化加剧,过度放牧和资源的开发利用,我国苦豆子野生资源量急剧下降。自然条件下苦豆子荚果不易开裂,致使种子不易散布,同时种子具有极高的硬实率,这些都不利于种子的正常萌发^[4],而种子的萌发情况会直接影响该资源的产量。目前对苦豆子的发芽特性虽有研究报道^[5-8],但其

都偏重于破除种皮硬实的研究,对于发芽率、发芽势和发芽指数的统计并不全面,各文献报道的最优发芽条件下发芽率在93%~100%不等,且都存在发芽检验时间偏长(10 d或15 d)的不足。为此,笔者较全面地研究了影响苦豆子种子发芽的温度、发芽床、光照等因素,以及苦豆子种子发芽动态,旨在确定适宜苦豆子种子发芽的最优条件,为制订苦豆子种子检验标准化规程提供依据。

1 材料

试验所用的苦豆子种子于2014年采自甘肃酒泉,经甘肃中医药大学鉴定专家鉴定后确认为豆科植物苦豆子的种子;试验所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 种子发芽前预处理

首先将种子用98%硫酸浸泡30 min,然后用大量清水迅

△ 基金项目:国家中医药管理局基金资助项目——国家基本药物所需中药材种子种苗繁育基地建设
* 硕士研究生。研究方向:中药资源开发与质量综合评价。
E-mail: 602887952@qq.com
[#] 通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:珍稀濒危和大宗常用中药资源可持续利用。电话:0931-8765304。E-mail:zyxyjl@163.com

速清洗干净,再用35℃温水浸泡29 h,最后用蒸馏水冲洗4~5次,备用。

2.2 发芽指标的计算和统计方法^[9]

将苦豆子种子的新鲜胚根伸出长度与种子长度等长视为发芽,每天记录萌发种子数至无萌发种子出现为止。各指标数据采用Duncan's多重比较。各指标计算公式如下:发芽率=(n_1/N)×100%;发芽势=(n_2/N)×100%;发芽指数=Σ(G_i/D_i)。式中, n_1 为最终正常发芽的粒数, N 为供试种子数, n_2 为种子发芽第2天的正常发芽种子数, G_i 为相应各天的正常发芽数, D_i 为从置床之日算起的天数。

2.3 不同发芽温度试验

在15、20、25、30℃不同温度的黑暗恒温条件下,用3层滤纸作发芽床,发芽床pH为6.0~7.5,每个温度条件下培育100粒种子,试验重复4次。计算发芽率、发芽指数和发芽势,选出最优发芽温度。

结果,发芽床为纸上和黑暗条件下,不同温度对苦豆子种子发芽率、发芽势和发芽指数的影响不同。各指标测定结果见表1,方差分析结果见表2。

表1 不同温度处理后苦豆子种子各发芽指标的测定结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab 1 Germination indicators of *S. alopecuroides* seeds after treated with different temperatures($\bar{x} \pm s, n=4$)

温度,℃	发芽率,%	发芽势,%	发芽指数
15	96.5±1.19	0±0.00**	70.5±2.11**
20	99.8±0.25	91.3±1.80	155.4±1.46
25	97.8±1.12	84.5±2.06*	148.3±2.44*
30	98.8±0.63	88.5±2.50	150.9±2.17

注:与20℃比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. at 20℃,* $P<0.05$,** $P<0.01$

表2 不同温度处理后各指标数据方差分析结果

Tab 2 Variance analysis results of indicators after treated with different temperatures

项目	发芽率				发芽势				发芽指数			
	自由度	均方	F	P	自由度	均方	F	P	自由度	均方	F	P
组间	3	7.73	2.49	0.110	3	7789.4	567.361	0.000	3	6602	382	0.000
组内	12	3.1			12	13.729			12	17.28		
合计	15				15				15			

方差分析结果表明,不同温度对苦豆子种子发芽率的影响差异无统计学意义($P>0.05$),但对发芽势和发芽指数的影响差异有统计学意义($P<0.01$)。针对各温度处理间的具体差异情况,将发芽势和发芽指数进行Duncan's多重比较,结果显示,15℃处理后的发芽指数和发芽势极显著低于其他温度处理组,且发芽势为0,说明过低的温度会显著影响苦豆子的发芽速度,致发芽时间显著延长。由表1可知,20℃处理后种子的发芽率、发芽势和发芽指数均最高,分别为99.8%、91.3%和155.4,30℃处理后种子的发芽情况介于20℃和25℃处理之间,说明较高温度时不会对苦豆子发芽产生太大影响。最适发芽温度应该在20℃和30℃二者选一,但是二者间差异无统计学意义,故进行发芽动态测定以从发芽速度上筛选最适发芽温度,结果见图1。

由表1、表2和图1可见,不同温度处理下发芽率无显著差异,但是达到最大发芽率的时间不同,20℃处理下达到最大发芽率所需时间最短,仅需5 d,而15℃处理下需要9 d。且在预试验中,对多个种子样本的分析结果发现,苦豆子种子表面带菌量较多,故种子在较高温度下培育时容易造成污染。经综

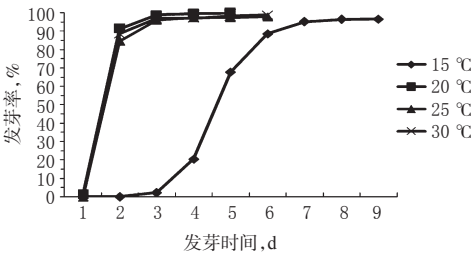


图1 不同温度处理后苦豆子种子发芽动态曲线

Fig 1 Seed germination dynamic curves of *S. alopecuroides* after treated with different temperatures

合分析,最终确定20℃为苦豆子种子发芽的培育温度。

2.4 不同发芽床试验

20℃时在不同发芽床条件下进行试验,根据发芽指标确定最优发芽床。发芽床条件共4种:(1)纸上,是在培养皿中铺3层湿润的发芽纸后置种。(2)纸间,是在培养皿中铺3层褶皱湿润的发芽纸,将种子放置于凹槽内。(3)砂上,是在培养皿中铺5 mm厚的湿砂后,将种子压入砂内即可。(4)砂中,是在培养皿中铺5 mm的湿砂,置种后再铺1层湿润的细砂。其中,所用纸为种子发芽专用发芽纸,pH 6.0~7.5;所用砂子直径0.05~0.8 mm,pH 6.0~7.5,洗净后150℃消毒2 h,使用时以无菌水拌成湿砂,达到手捏成团、放手即散开的状态。试验中数次加水保持湿润,每天记录发芽种子数,计算发芽率、发芽指数和发芽势,选出最优发芽床。每个发芽床条件下培育100粒种子,试验重复4次。

结果,在20℃的发芽温度和黑暗条件下,不同发芽床对苦豆子种子发芽率、发芽势和发芽指数的影响不同。各指标测定结果见表3,方差分析结果见表4。

表3 不同发芽床条件下苦豆子种子各发芽指标的测定结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab 3 Germination indicators of *S. alopecuroides* seeds under different germination beds($\bar{x} \pm s, n=4$)

发芽床	发芽率,%	发芽势,%	发芽指数
纸上	97.8±0.95	95.0±1.47	185.5±3.35
纸间	95.5±1.44**	88.3±4.61*	159.6±3.94**
砂上	99.5±0.29	96.8±0.48	183.0±0.76
砂间	95.0±0.58**	10.0±1.83**	75.1±2.33**

注:与砂上比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. on sand,* $P<0.05$,** $P<0.01$

表4 不同发芽床条件下各指标数据方差分析结果

Tab 4 Variance analysis results of indicators under different germination beds

项目	发芽率				发芽势				发芽指数			
	自由度	均方	F	P	自由度	均方	F	P	自由度	均方	F	P
组间	3	17.4	5.12	0.016	3	6998.2	259.592	0.000	3	10728	326.9	0.000
组内	12	3.4			12	26.958			12	32.82		
合计	15				15				15			

由表3、表4可见,不同发芽床对苦豆子种子发芽率的影响差异有显著的统计学意义($P<0.05$),对发芽势和发芽指数的影响差异有极显著的统计学意义($P<0.01$)。对不同发芽床条件下的各指标进行Duncan's多重比较,结果表明,砂间处理组的种子发芽率极显著低于砂上处理组,且发芽指数和发芽势极显著低于其他处理组,这可能与砂间的透气性差有关。就整体发芽情况而言,砂上处理组效果最好,发芽率、发芽势和发芽指数分别为99.5%、96.8%和183.0,均为各组中较高,可

能与其透气性和保水性较好、能减轻和抑制杂菌的滋生和扩散有关;纸上处理组次之。综上,发芽床以砂上为宜。

2.5 不同光照条件试验

在20℃的发芽温度下,用3层发芽纸作发芽床,设置光照(2 000 lx,16 h)和黑暗2种处理方法进行苦豆子种子发芽试验。试验中保持发芽纸湿润,每天记录种子发芽数,计算发芽率、发芽指数和发芽势,选出最优光照条件。不同条件下培育100粒种子,试验重复4次。

结果,在20℃的发芽温度和发芽床为纸上条件下,光照和黑暗条件下处理的苦豆子种子发芽率、发芽势和发芽指数测定结果见表5,方差分析结果见表6。

表5 不同光照条件下苦豆子种子各发芽指标的测定结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab 5 Germination indicators of *S. alopecuroides* seeds under different light conditions($\bar{x} \pm s, n=4$)

光处理	发芽率, %	发芽势, %	发芽指数
光照	95.8±1.60	89.5±1.55	167.0±6.23
黑暗	96.5±1.19	84.8±4.27	151.2±8.01

表6 不同光照条件下各指标数据方差分析结果

Tab 6 Variance analysis results of indicators under different light conditions

项目	发芽率				发芽势				发芽指数			
	自由度	均方	F	P	自由度	均方	F	P	自由度	均方	F	P
组间	3	1.13	0.14	0.72	3	502.45	2.439	0.169	3	45.13	1.093	0.336
组内	12	7.96			12	206.03			12	41.29		
合计	15				15				15			

由表5、表6可知,光照和黑暗处理对苦豆子种子发芽情况的影响差异无统计学意义($P>0.05$);黑暗处理后的种子发芽率略高(96.5%),但其发芽势和发芽指数略低,分别为84.8%和151.2。在不同光照处理条件下苦豆子种子均能正常发芽,且各指标间差异无统计学意义,说明苦豆子种子为光不敏感种子。以下试验选用光照条件下培育种子。

2.6 发芽动态测定和发芽计数时间

苦豆子种子经98%的硫酸处理30 min,再用35℃温水浸种29 h后,以20℃为发芽温度、砂上为发芽床、光照下培育7 d。测定每天的种子发芽数,绘制发芽时间-发芽率的发芽动态图,确定初次和末次计数时间。共培育100粒种子,试验重复4次。以达到50%发芽率的天数为初次计数时间,以无种子萌发的天数为末次计数时间。其发芽率和发芽动态曲线分别见表7、图2。

表7 优选条件下苦豆子种子在7 d内的发芽率测定结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab 7 Germination rate of *S. alopecuroides* seeds within 7 d under optimal condition($\bar{x} \pm s, n=4$)

时间,d	发芽率, %
1	26.5±1.19 ^a
2	96.8±0.48 ^a
3	98.0±0.41
4	99.0±0.71
5	99.5±0.29
6	99.5±0.29
7	99.5±0.29

注:与第5天发芽率比较,^a $P<0.01$

Note: vs. seed germination rate on fifth day, ^a $P<0.01$

由图2可见,种子从置床第1天起就开始萌发,第2天发芽率达90%以上,至第6天时已无新种子萌发。因此,可选择第2天进行初次计数,同时作为发芽势的统计时间。对苦豆子种

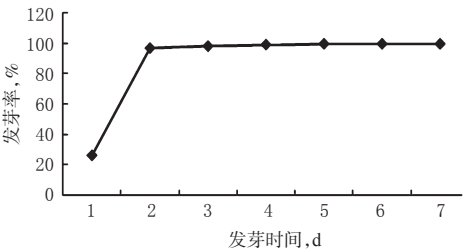


图2 优选条件下苦豆子种子发芽动态曲线

Fig 2 Germination dynamics curve of the seeds of *S. alopecuroides* under optimal condition

子每天的发芽率进行统计学检验。结果显示,第2天与第5天的发芽率相比差异有统计学意义($P<0.01$),第3天、第4天的发芽率与第5天的发芽率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。为避免个别种子差异导致发芽延迟,可在第4天进行末次计数,并作为发芽率的统计时间和结束试验的时间。

3 讨论

苦豆子种皮较厚、透水性差,有硬实现象,导致自然状态下种子呈物理休眠状态、萌发率低^[10]。打破种子休眠的方法有温度处理、机械处理、激素处理等。关于打破苦豆子种子休眠的方法,文献报道以采用硫酸较多。文献[5]研究了对苦豆子种子硬实的处理方法,结果显示经98%硫酸处理1~1.5 h后,其7 d的发芽势为92.2%~95.5%,15 d的发芽势为97.77%~100%。王进等^[6]研究硫酸浓度和处理时间对苦豆子种子萌发的影响,结果表明相同时间内随硫酸浓度的升高,种子硬实率降低、烂芽率升高,得出种子经最适宜的方式处理后10 d的发芽率为93%。陈晓丽等^[7]研究硫酸处理对苦豆子种子发芽的影响,结果表明,不同等级的苦豆子种子应采用不同的硫酸浓度和处理时间,最适处理条件下,各级种子在5 d的发芽率分别为1级种子99.3%、2级种子92.7%、3级种子79.3%。在以上研究中,均提及种子经各种处理后发芽率均有不同程度的升高,但未报道或很少提及各条件对种子发芽势和发芽指数的影响。此外,仅用浓硫酸处理,很难把握处理的细节问题,比如时间过长会致种皮脱落,而时间太短又无法打破种子的硬实。本研究首次将浓硫酸处理和温水浸种条件结合在一起,取得了较好的效果,即用98%硫酸处理30 min,再用30℃温水浸泡29 h后,在适宜的发芽条件下,种子在第2天发芽率已超过90%,最终发芽率可高达99.5%,显著缩短了发芽时间,提高了发芽率。

低温不利于苦豆子种子发芽,其原因可能是低温会减慢种子内部物质的活化,影响发芽速度,并进一步影响发芽率。但30℃处理的种子发芽情况介于20℃和25℃之间,其原因尚待进一步研究。

本研究表明,砂间处理的发芽势较低,除砂间透气性较差外,其原因还可能是统计砂间的发芽指标时只能待子叶破土后才能统计,即因其统计标准与其他发芽床不一致所致。纸上和纸间处理的通气性虽好,但其保水性相对较差,致使发芽情况不及砂上处理。因此,水分和空气对苦豆子种子发芽均具有重要的作用,在本试验中认为以砂上处理为宜。

光照和黑暗条件下苦豆子发芽情况无显著差异,但考虑到种子幼苗鉴定,建议种子发芽后应每天给予一定时间的光照。

综上,本试验得出苦豆子种子发芽的适宜培育条件为以98%硫酸处理30 min+35℃温水浸泡29 h,在砂上20℃光照培养;在种子置床第2天初次计数,第4天末次计数并统计发芽率并结束试验,此可作为苦豆子种子质量检验的标准化方法。

参考文献

黄芪种子发芽检验标准化研究[△]

张延红*,李金田,卢有媛,杜 骏[#](甘肃中医药大学药学院,兰州 730000)

中图分类号 R931.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)07-0998-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.07.41

摘要 目的:确定适宜于黄芪种子萌发的最优条件,为制订黄芪种子检验规程提供依据。方法:以98%硫酸处理30 min+35℃温水浸泡9 h打破种子休眠,通过不同温度、不同发芽床和不同光照条件进行处理,以发芽率、发芽势和发芽指数3个指标对不同处理方法进行评价。结果:随着温度的升高,种子的发芽率、发芽指数和发芽势呈下降趋势;30℃处理下种子发芽率、发芽指数和发芽势显著低于其他处理,其中15℃的发芽率最高,但与20℃处理下的发芽率不存在显著差异;不同发芽床对发芽率的影响不存在显著性差异,但砂床可较好地抑制杂菌增长;无论是光照还是黑暗条件,黄芪种子均能正常发芽。在砂上15℃黑暗培养,黄芪种子发芽效果最好,其发芽率、发芽势和发芽指数分别为 $(98.5 \pm 0.65)\%$ 、 $(85.5 \pm 0.87)\%$ 和 175.8 ± 2.31 ,且发芽周期仅为4 d。结论:建议黄芪种子质量检验标准方法为将其在砂上于15℃黑暗培养,以发芽第2天、第4天分别作为初次、末次计数时间计算其发芽指标。该检验方法简单、可控,且发芽周期短,发芽率高。

关键词 黄芪;种子;种子休眠;发芽温度;发芽床;发芽计数时间;发芽率;发芽指数;发芽势

Study on Standardization of Germination Test of *Astragalus membranaceus* Seed

ZHANG Yanhong, LI Jintian, LU Youyuan, DU Tao (College of Pharmacy, Gansu University of TCM, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To select the optimum conditions for germination test of *Astragalus membranaceus* seed and provide reference for the formulation of testing rules of *A. membranaceus* seed. METHODS: First, the dormancy of *A. membranaceus* seeds were broken by soaking seed with 98% H₂SO₄ for 30 min and 35℃ warm water for 9 h, then treated with different temperatures of germination, different germinating beds and light conditions. Different treatment methods were evaluated by germination rate, germination potential and germination index. RESULTS: With the increase of temperature, germination rate, germination potential and germination index decreased. At 30℃, germination rate, germination index, and germination potential were significantly lower than those of seed with other treatments, in which the germination rate was the highest at 15℃; but there wasn't significant difference in germination rate of 15℃ and 20℃. There were no significant differences in germination rate of different germination beds, but sand bed could restrain bacterial growth well. Under both light and dark conditions, seed could normally germinate. The appropriate condition of *A. membranaceus* seed germination was at 15℃, sand bed and dark. The germination rate, germination potential and germination index were $(98.5 \pm 0.65)\%$, $(85.5 \pm 0.87)\%$ and 175.8 ± 2.31 , respectively. Meanwhile, the germination period was only 4 days. CONCLUSIONS: Suggested quality control method of *A. membranaceus* seed is that at 15℃, sand bed and dark. The second day of germination as initial counting time and forth day as the last counting time are used to calculate germination index. This method is easy and controllable. It also has short germination period and high germination rate.

KEYWORDS *Astragalus membranaceus*; Seed; Seed dormancy; Germination temperature; Germination bed; Germination counting time; Germination rate; Germination index; Germinative force

[1] 中国植物志编辑委员会.中国植物志[M].北京:科学出版社,1993:80.
[2] 江苏新医学院.中药大辞典[M].上海:上海科技出版社,1997:1 294.
[3] 何子清,冯志军,漆燕玲.苦豆子种子品质检验及质量标准研究[J].中国种业,2015(2):38.
[4] 李晓莺,曹有龙.苦豆子组织培养初步研究[J].甘肃农业科技,2004,5(12):12.
[5] 巴拉提·司马义,卡德尔·阿布都热西提.光果甘草和苦豆子硬实种子处理方法研究[J].种子,2011,30(3):57.
[6] 王进,王泽基.苦豆子种子发芽特性研究[J].干旱地区农业研究,2007,8(5):202.
[7] 陈晓丽,郭玉海,崔旭盛,等.硫酸处理对苦豆子种皮结构和发芽的影响[J].中国种业,2011(8):43.
[8] 李阳春,杨扶德.甘肃产苦豆子种子质量研究[J].世界中医药,2013,8(5):560.
[9] 国家农作物种子标准化技术委员会. GB/543.1~3543.7-1995《农作物种子检验规程》实施指南[S].北京:中国标准出版社,2000:43-48.
[10] 冯燕.苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)不同种群种子物理休眠释放的研究[D].兰州:兰州大学,2007:8.

△ 基金项目:国家中医药管理局基金资助项目—国家基本药物所需中药材种子种苗繁育基地建设

* 副教授,博士。研究方向:药用植物育种和组织培养方面的教学和研究。电话:0931-8765393。E-mail: zhyh456789@163.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:药用植物育种的教学和研究。电话:0931-8765393。E-mail: gslzdt@163.com

(收稿日期:2015-05-28 修回日期:2015-07-07)
(编辑:刘 萍)