

## 锁阳种子生活力测定及前处理的方法

王进<sup>1,3</sup>, 罗光宏<sup>1,2,\*</sup>, 张勇<sup>1,3</sup>, 颜霞<sup>1</sup>, 祖廷勋<sup>2,3</sup>, 张有富<sup>1</sup>

河西学院<sup>1</sup>农业与生物技术学院; <sup>2</sup>凯源生物技术开发中心; <sup>3</sup>甘肃省高校河西走廊特色资源利用省级重点实验室, 甘肃张掖 734000

**摘要:** 以野生充分成熟的锁阳净种子为材料, 研究了附属物清除、硬实破除及生活力测定的方法。结果表明, 清除锁阳种子附属物最有效的方法是开水烫种, 冷至室温浸种24 h后用尼龙纱网搓揉和1%的NaOH溶液处理。破除硬实, 去除种皮最适宜的方法是1.0 mol·L<sup>-1</sup>的NaOH处理5 h、1.5 mol·L<sup>-1</sup>的NaOH处理4~5 h、2.0 mol·L<sup>-1</sup>的NaOH处理3~5 h。测定锁阳种子生活力的最佳方法是20 °C光照条件下离体培养15 d。

**关键词:** 锁阳种子; 生活力; 离体培养; 硬实; 附属物

## Pretreatment Methods and Determination of Seed Viability in *Cynomorium songaria* Rupr Seeds

WANG Jin<sup>1,3</sup>, LUO Guang-Hong<sup>1,2,\*</sup>, ZHANG Yong<sup>1,3</sup>, YAN Xia<sup>1</sup>, ZU Ting-Xun<sup>2,3</sup>, ZHANG You-Fu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Agriculture and Biotechnology, <sup>2</sup>Kaiyuan Bio-Tech Development Center, <sup>3</sup>Microalgae Engineering Research Center of Gansu Province, Hexi University, Zhangye, Gansu 734300, China

**Abstract:** Using wild, fully mature and wet seeds of *Cynomorium songaria* as materials, the different methods to remove appurtenances, break hard seedness and determinate seed viability were studied. The results showed that the most effective method to remove seeds appurtenances was boiling seeds, soaking seeds for 24 h after cooling to room temperature, and then rubbing with nylon gauze and treating with 1% NaOH solution. The most suitable method for breaking hard seeds was treating with 1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH for 5 h, 1.5 mol·L<sup>-1</sup> NaOH for 4–5 h, and 2 mol·L<sup>-1</sup> NaOH for 3–5 h. The best method to measure seed viability was culturing *in vitro* for 15 d under the condition of light of 20 °C.

**Key words:** *Cynomorium songaria*; seed viability; culturing *in vitro*; hard seeds; appurtenances

锁阳为锁阳科(Cynomoriaceae)锁阳属(*Cynomorium*)多年生肉质寄生草本种子植物(马毓泉1989), 多寄生于蒺藜科(*Zygophyllaceae*)白刺属(*Nitraria*)、霸王属(*Zygophyllum*) (陈叶等2010)、骆驼蓬属(*Peganum*) (王进等2011)植物的根部。于寄主的分布系统相同, 锁阳多生于干旱沙漠地带及荒漠区的湖盆边缘和洪积、冲积扇缘地带的盐渍化沙地(马毓泉1989; 黄林芳等2010), 被列为名贵中药材的上品, 素有“沙漠人参”之称。现代研究表明, 锁阳在抗肿瘤、调节人体免疫、延缓衰老和防治心血管疾病等方面也具有重要作用(国家药典委员会2005; 王一峰等2006; 陶晶等1999)。除药用价值外, 锁阳还可提炼栲胶, 用于酿酒和饲料等。因此它具有重要的经济和药用价值(陈圆华等2005; 张思巨和张淑运1991)。近年来由于掠夺式采挖, 使药源不断减少, 锁阳野生资源已处于濒临枯竭状态(高永1996)。为拯救和保护锁阳资源, 结

合生态恢复和盐碱地改造, 在西北干旱地区进行人工种植锁阳刻不容缓(金自学2001)。

附属物和种子硬实是物种传播延续对环境的一种特殊适应, 附属物是为了更好的完成传播途径, 而硬实特性是对极端环境的一种适应(王进等2010)。影响锁阳种子发芽的原因之一就是种子表面的附属物和本身具有的硬实特性。因此, 对附属物清除和硬实破除前处理显得尤为重要。

同时, 种子生活力是种子发芽的潜在能力, 对预测休眠种子的发芽力和快速预测种子发芽率具有重要意义。研究锁阳种子生活力测定方法, 对

收稿 2013-08-12 修定 2013-11-13

资助 甘肃省科技支撑计划(0804NKCG082)、国家自然科学基金(30960043)和甘肃省中小企业创新基金(1110-FCCG112)。

\* 通讯作者(E-mail: luoguanghong@163.com; Tel: 0936-8280003)。

锁阳种子质量标准制定、种子质分级及提高接种率具有重要意义。在测定种子生活力的方法中,应用最广的是德国莱康(Lakon)于1942年提出的TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride)法、红墨水染色法、溴麝香草酚蓝染色法和离体胚培养法等(尹燕桦等1997; 傅家瑞等1992; 沈宇峰等2008)。本实验采用物理机械方法和化学方法,清除种子外的附属物质及破除种子硬实,后用TTC染色法、红墨水染色法、溴麝香草酚蓝染色法、靛蓝洋红染色法和离体胚培养法处理去种皮种子,确定最佳方法,为进一步了解锁阳种子的萌发特性提供科学依据。

## 材料与方 法

### 1 材料来源

2008年8月于甘肃省武威市民勤县泉山镇西六村一社(38°51'N, 103°23'E)海拔1 334 m处,采集到充分成熟的寄生于唐古特白刺根部的锁阳(*Cynomorium songaria* Rupr)果穗,在实验室内经过脱粒清选精选,获净种子300 g,置入4 °C冷藏箱中备用。

### 2 试验方法

#### 2.1 不同处理对锁阳种子附属物清除及硬实破除的试验

取锁阳种子100粒,置入30 mL烧杯中,用6种不同方法处理种子。(1)用500万单位的果胶酶:纤维素酶(1:1)混合液在30 °C下处理24 h; (2)用开水烫种,冷至室温浸种24 h后用尼龙纱网搓揉; (3)用浓硫酸处理60 min,用尼龙纱网搓揉; (4)用1%的NaOH溶液浸种3 h; (5)用浓HCl浸种60 min; (6)用10%的NaClO浸种60 min。以冷水浸种24 h后尼龙纱网搓揉的种子为对照,测定附属物清除率。附属物清除率(%)=清除附属物的种子数/供试种子数×100%。硬实率(%)=硬实种子数/供试种子数×100%。每个处理重复4次。

#### 2.2 不同浓度NaOH处理对锁阳种子硬实率和种胚生活力的影响

取开水烫种处理的种子,用1、2、3、4和5 mol·L<sup>-1</sup>的NaOH处理0.5、1.0、1.5和2.0 h,之后用蒸馏水浸泡24 h,测定硬实率。同时用NaOH处理去皮的种子在20 °C、36 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>的恒温培养箱内做离体胚培养,测定生活力。以上每处理重复4次,每重复100粒种子。

### 2.3 不同锁阳种子生活力测定方法

从种子中取出种仁,用0.1%的HgCl<sub>2</sub>消毒2 min,用以下6种方法测定生活力。TTC染色法:用1%的TTC溶液在黑暗条件下35 °C染色24 h。溴麝香草酚蓝法:将种子置于0.1%的溴麝香草酚蓝(BTB)琼脂凝胶薄层培养皿中,加盖后置于35 °C的恒温箱中培养5 h。红墨水染色法:用5%的红墨水在35 °C下染色20 min,倒去红墨水后用水冲洗至溶液无色。靛蓝洋红染色法:用2%的靛蓝洋红在35 °C下染色200 min,倒去靛蓝洋红后用水冲洗至溶液无色。离体胚培养法:将种子置于培养皿,在20和25 °C的恒温箱中,在36 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>光照条件下培养15 d。以上处理重复4次,每重复100粒种子,以用开水浸泡10 min的种仁为对照处理。

### 2.4 统计分析

以SPSS 10.0统计软件对数据进行统计分析,以单因素方差分析(One-way ANOVA)最小显著差法(LSD)和新复极差法(Dance)在0.05和0.01概率水平确定各平均值间的差异显著性。分析结果以平均数±标准差表示。

## 实验结果

### 1 不同处理对锁阳种子附属物清除及硬实破除的影响

从表1可见,开水烫种处理和1%的NaOH溶液处理的种子附属物清除率极显著高于其他处理。果胶酶+纤维素酶混合液处理和NaClO处理种子对附属物的清除有一定效果,但清除率极低。HCl处理对种子上的附属物无清除。冷水浸种后纱布搓

表1 不同处理对锁阳种子附属物清除及硬实破除的影响

Table 1 Influence of different treatments on removing appurtenances and breaking hard seeds of *C. songaria*

处理	附属物清除率/%	硬实率/%
对照	33.00±3.00 <sup>Cc</sup>	100±0 <sup>Aa</sup>
果胶酶+纤维素酶	11.33±2.52 <sup>Dd</sup>	100±0 <sup>Aa</sup>
开水	99.67±0.58 <sup>Aa</sup>	100±0 <sup>Aa</sup>
浓硫酸	64.00±4.00 <sup>Bb</sup>	75±4.58 <sup>Cc</sup>
1% NaOH	100.00±0 <sup>Aa</sup>	12±4.00 <sup>Dd</sup>
浓HCl	0±0 <sup>Ec</sup>	100±0 <sup>Aa</sup>
10% NaClO	9.00±2.64 <sup>Dd</sup>	86±3.06 <sup>Bb</sup>

同列中不同大写字母表示在0.01水平差异显著,不同小写字母表示在0.05水平差异显著。下表同此。

揉可使部分附属物清除。

从不同处理对种子硬实破除效果来看, NaOH处理的种子硬实率为12%, 极显著低于其他处理( $P<0.01$ ), 其次是浓硫酸处理, 第三为NaClO处理, 其硬实率极显著低于剩余4种处理( $P<0.01$ ), 其他处理对硬实率无影响, 仍然是100%。综上所述, 清除锁阳种子附属物最有效的方法是开水烫种处理和1%的NaOH溶液处理, 破除硬实最有效的方法是NaOH溶液处理。

## 2.2 不同浓度NaOH处理对锁阳种子硬实率和种胚致死率的影响

从表2来看, 同一NaOH浓度下, 随处理时间的延长, 硬实率极显著降低( $P<0.01$ ); 而在相同时间处理下, 随NaOH浓度的提高, 硬实率显著降低( $P<0.05$ )。1.0 mol·L<sup>-1</sup>的NaOH处理5 h、1.5 mol·L<sup>-1</sup>的NaOH处理4~5 h和2.0 mol·L<sup>-1</sup>的NaOH处理3~5 h都将硬实率降低为0。

随处理时间的延长, 锁阳种子致死率在同一浓度下显著降低( $P<0.05$ )。在相同时间处理下, 随

表2 不同浓度NaOH处理对锁阳种子硬实率和致死率的影响

Table 2 Influence of different concentrations of NaOH treatment on hard seeds rate and lethality rate of *C. songaria* seeds

NaOH浓度/mol·L <sup>-1</sup>	处理时间/h	硬实率/%	致死率/%
0.5	1	96.25±0.75 <sup>Aa</sup>	1.75±0.96 <sup>ABCabc</sup>
	2	82.75±0.85 <sup>Bb</sup>	2.00±0.82 <sup>ABab</sup>
	3	73.00±1.47 <sup>Cc</sup>	2.50±1.00 <sup>Aa</sup>
	4	51.25±2.56 <sup>Ef</sup>	2.50±0.58 <sup>Aa</sup>
	5	33.50±1.55 <sup>Gh</sup>	0.75±0.96 <sup>BCDcd</sup>
1.0	1	69.5±2.40 <sup>Cd</sup>	1.00±0.82 <sup>BCDbcd</sup>
	2	35.75±1.18 <sup>FGh</sup>	2.00±0.82 <sup>ABab</sup>
	3	12.00±0.41 <sup>Ij</sup>	2.00±0.82 <sup>ABab</sup>
	4	2.00±0.41 <sup>Ik</sup>	0.50±1.00 <sup>CDd</sup>
	5	0±0 <sup>jk</sup>	0±0 <sup>Dd</sup>
1.5	1	60.00±1.47 <sup>De</sup>	0.50±0.58 <sup>CDd</sup>
	2	27.50±1.26 <sup>Hi</sup>	0.25±0.50 <sup>Dd</sup>
	3	2.50±0.29 <sup>jk</sup>	0.25±0.50 <sup>Dd</sup>
	4	0±0 <sup>jk</sup>	0±0 <sup>Dd</sup>
	5	0±0 <sup>jk</sup>	0±0 <sup>Dd</sup>
2.0	1	39.25±1.65 <sup>Fg</sup>	0.25±0.50 <sup>Dd</sup>
	2	3.25±0.63 <sup>Jj</sup>	0±0 <sup>Dd</sup>
	3	0±0 <sup>jk</sup>	0±0 <sup>Dd</sup>
	4	0±0 <sup>jk</sup>	0.25±0 <sup>Dd</sup>
	5	0±0 <sup>jk</sup>	0±0 <sup>Dd</sup>

NaOH浓度的提高, 测定的种子致死率有降低趋势。1.0 mol·L<sup>-1</sup>的NaOH处理5 h、1.5 mol·L<sup>-1</sup>的NaOH处理4~5 h和2.0 mol·L<sup>-1</sup>的NaOH处理2~5 h都将致死率降低为0(表2)。

锁阳种子生活力很高, 随NaOH处理时间的延长和浓度的增加, 种子致死率下降, 破除锁阳种子硬实, 去除种皮最适宜的方法是1.0 mol·L<sup>-1</sup>的NaOH处理5 h、1.5 mol·L<sup>-1</sup>的NaOH处理4~5 h、2.0 mol·L<sup>-1</sup>的NaOH处理3~5 h。

## 2.3 不同测定锁阳种子生活力的方法

从TTC对种子的染色情况看, 14%种仁通体鲜红, 86%种仁乳白色, 无染色迹象(图1-A), 从TTC染色理论判断, 锁阳种子生活力为14%。从溴麝香草酚蓝染色情况看, 20%种仁表面泛黄色, 52%种仁乳白色, 28%种子表面微呈蓝色, 种子周围无蓝色晕圈, 完全死亡种子周围有蓝色晕圈(图1-B), 从其染色理论看, 种子生活力为20%。从红墨水染色情况看, 20%种仁浅表染成粉红色, 80%种仁乳白色, 无染色迹象(图1-C), 从其染色理论看, 种子生活力为80%。从靛蓝洋红染色情况看, 28%种仁通体染成淡蓝色, 72%种仁乳白色, 无染色迹象(图1-D), 种子生活力为72%。从离体胚培养的结果来看, 在25 °C下培养的种仁, 有3%的种仁遭霉菌污染, 其余种仁新鲜有光泽且种仁长度增加(图1-E), 种子生活力为97%。在20 °C下, 所有种仁都新鲜有光泽, 种仁长度增加(图1-F), 种子生活力为100%。TTC染色法和溴代麝香草酚蓝法随处理时间的延长和种子处理条件的改变, 有生活力表现的种子会显著增加。红墨水染色法、靛蓝洋红染色法结论则与TTC染色法和溴代麝香草酚蓝法相矛盾。

综上所述, 锁阳种仁质地紧密, 胚呼吸极弱, 用快速染色的方法无法快速测定其生活力, 25 °C下离体培养, 会使部分种子遭受霉菌污染而散失生活力。测定锁阳种子生活力的最佳方法是20 °C光照条件下离体培养15 d。

## 讨 论

### 1 种子附属物的种类与清除

种子附属物是种子上的保护物质, 对物种的延续和在逆境中的繁衍具有重要意义, 其成分与成熟环境和母体营养有关。生长在干旱荒漠中区



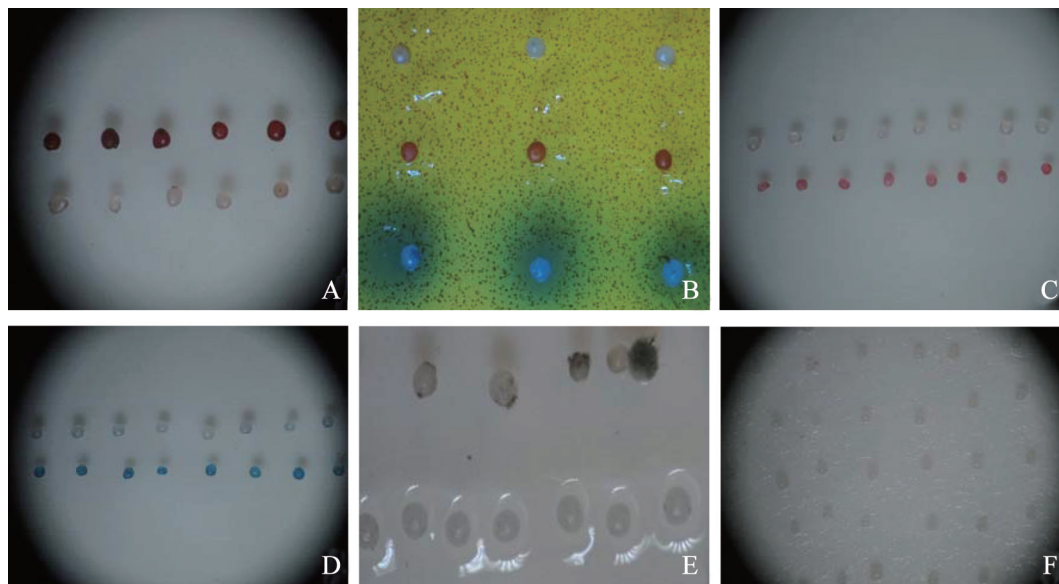


图1 不同测定方法的锁阳种子

Fig.1 Different methods of *C. songaria* seeds

A: TTC染色法; B: 溴麝香草酚蓝法; C: 红墨水染色; D: 靛蓝洋红染色; E: 25 °C 离体胚培养; F: 20 °C 离体胚培养。

锁阳, 其种子着生在富含淀粉的果穗表面, 其表面的附属物可能是淀粉、果胶和纤维类物质, 因此遇到强酸或碱, 就会因化学反应而清除。在遇到热水处理后用机械搓揉的办法也可将其清除, 说明附属物与种子结合并不太紧密。

## 2 种皮软化与破除硬实

锁阳种子细小圆滑且有坚硬的种皮, 种子发芽缓慢, 软化种皮, 使种仁外漏, 是进行生活力测定的前提。热水处理、浓 $H_2SO_4$ 化学处理、NaOH处理、砂纸机械处理和低温冷冻处理是打破硬实种子休眠的有效方法, 但结合锁阳种子特征, 选用NaOH溶液处理种子, 使其种皮中的脂类溶解, 色素析出, 种子吸胀, 硬实破除。

## 3 种子生活力测定方法的选择

有研究认为, 硬实种子是充分成熟的种子, 具有高活力。但该试验中, 因锁阳种子胚乳结构致密, 种胚呼吸弱, 种胚深埋于胚乳中(苏格尔和包玉英1999; 李天然等1994), 用TTC染色法、溴麝香草酚蓝法、红墨水染色法及其原理不能检验其活力状况(Bekendam和Gob 1979; Woodstock 1973), 这一结果与陈贵林等(2011)所述锁阳种子生活力的结论不一致(种胚在强光下用0.5% TTC染色)。本着成本低廉、省时快速、方法简便, 不受休眠限

制和结果准确的原则, 用离体胚培养法, 根据胚在培养过程中的变化, 可以判断种子生活力变化。

温度影响种子的呼吸和生长, 但也影响微生物的活动。对大多数植物, 20 °C是种子萌发的适宜温度。由于锁阳种子萌发受休眠限制, 萌发非常缓慢, 在种仁离体胚培养过程中, 在20 °C下培养15 d, 种仁新鲜有光泽; 但在25 °C下培养15 d, 部分种仁因微生物污染而水肿或腐烂, 就无法判断其生活力。因此, 选择20 °C下种仁培养15 d能更准确判断种子生活力。

## 参考文献

- 陈贵林, 安天悦, 靳尚武, 陈青(2011). 锁阳种子特性及活力的研究. 种子, 30 (1): 21~23
- 陈叶, 罗光宏, 王进, 郑天翔(2010). 锁阳的一个新寄主植物. 中草药, 42 (5): 1007
- 陈圆华, 谢志兵, 董静洲(2005). 锁阳综合研究概况. 经济林研究, 23 (4): 114~117
- 傅家瑞(1992). 种子生理. 北京: 中国农业出版社, 18~21, 68~70
- 高永(1996). 寄生植物锁阳的开发利用前景. 内蒙古林学院学报(自然科学版), 9 (3): 45~49
- 国家药典委员会编(2005). 中国药典. 北京: 化学工业出版社, 261~262
- 黄林芳, 谢彩香, 陈士林, 段宝忠, 孙成忠, 凯撒·苏来曼, 王丽芝(2010). 沙生药用植物锁阳产地适宜性的定量评价. 植物学报, 45 (2): 205~211

- 金自学(2001). 河西走廊灌丛植被的生态学研究. 农村生态环境, 17 (2): 17~21
- 李天然, 苏格尔, 刘基焕, 许月英, 阎国(1994). 寄生药用有花植物锁阳在寄主体内的繁殖. 内蒙古大学学报(自然科学版), 25 (6): 673~679
- 马毓泉(1989). 内蒙古植物志(第3卷). 第2版. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 583~585
- 沈宇峰, 王志安, 俞旭平, 沈晓霞(2008). 白术种子生活力测定方法及其与发芽率的相关性研究. 中国中药杂志, 33 (3): 248~250
- 苏格尔, 包玉英(1999). 锁阳(*Cynomorium songaricum* Rupr.)的寄生生物学特性及其人工繁殖. 内蒙古大学学报(自然科学版), 30 (2): 214~218
- 陶晶, 屠鹏飞, 徐文豪, 陈定一(1999). 锁阳茎的化学成分及其药理活性研究. 中国中药杂志, 24 (5): 292
- 王进, 罗光宏, 陈叶, 张勇, 祖廷勋(2011). 锁阳寄主植物的一个国内新纪录——多裂骆驼蓬. 中国中药杂志, 36 (12): 3244~3246
- 王一峰, 王春霞, 杨文玺, 王俊龙, 高素芳, 张继(2006). 锁阳资源的综合开发利用研究. 中兽医医药杂志, 3: 65~68
- 王进, 张勇, 张有富, 颜霞, 孟嫣(2010). 苦马豆和披针叶黄华种子硬实特性与活力关系. 植物生理学通讯, 46 (12): 1219~1224
- 尹燕桦, 董学会(1997). 种子学实验技术. 北京: 中国农业出版社, 87~96
- 张思巨, 张淑运(1991). 中药锁阳的化学成分研究. 2nd ed. 中国药学杂志, 26 (11): 649
- Bekendam J, Gob R (1979). Handbook for Seedling Evaluation. Zürich: Internatinal Seed Testing Association, 113~116
- Woodstock LW (1973). Physiological and biochemical tests for seed vigor. Seed Sci Technol, 1: 127~157