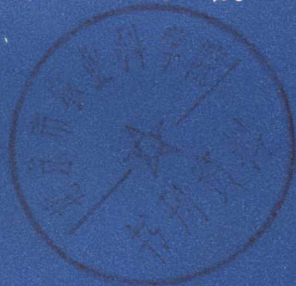


11875

农业种子

四唑测定手册

[美] D.F. 格雷勃 编



农业出版社

# 农业种子四唑测定手册

[美] D. F. 格雷勃编

颜启传译 叶常丰 毕辛华校

农业出版社

TETRAZOLIUM TESTING  
HANDBOOK  
For Agricultural Seeds

Contribution No.29  
to the Handbook on Seed Testing  
Prepared by  
The Tetrazolium Testing Committee  
of the  
Association of Official Seed Analysts  
Don F. Grabe, Editor  
Published by the Association

1970

农业种子四唑测定手册

〔美〕D. F. 格雷勃编

颜启传译 叶常丰 毕辛华校

农业出版社出版 新华书店北京发行所发行  
农业出版社印刷厂印刷

787×1092 毫米 32 开本 1.25 印张 8 插页 22 千字

1979 年 3 月第 1 版 1979 年 3 月北京第 1 次印刷

印数 1—32,000 册

统一书号 16144·1850 定价 0.25 元

## 内 容 简 介

四唑染色快速测定种子生活力方法目前已在全世界广泛应用。

本手册对四唑快速测定农作物种子生活力的设备、溶液、种子准备、染色时间、鉴定知识和标准，以及各类种子测定方法作了全面、系统而简明扼要的综述，并附有形象清晰的染色图样和彩色图版，很有助于读者正确掌握四唑测定的知识和技术。

这本手册是目前关于四唑测定方法较全面、较系统、较有实用价值的参考书，可供种子工作者和农业院校师生参考。

# 目 录

|                      |    |
|----------------------|----|
| 引言 .....             | 1  |
| 一、种子来源 .....         | 1  |
| 二、种子数目 .....         | 2  |
| 三、设备 .....           | 2  |
| 四、溶液 .....           | 3  |
| 1. 四唑溶液 .....        | 3  |
| 2. 乳酸苯酚溶液 .....      | 4  |
| 五、温度 .....           | 4  |
| 六、光 .....            | 5  |
| 七、测定种子的准备 .....      | 5  |
| 1. 预措 .....          | 5  |
| 2. 染色准备 .....        | 6  |
| 八、染色 .....           | 9  |
| 九、四唑测定的鉴定 .....      | 9  |
| 1. 鉴定准备 .....        | 9  |
| 2. 鉴定的一般知识 .....     | 10 |
| 3. 结果的正确性 .....      | 14 |
| 4. 鉴定的组别 .....       | 16 |
| A组: 玉米、高粱、小粒谷类 ..... | 16 |
| B组: 大粒禾本科牧草种子 .....  | 20 |
| C组: 小粒禾本科牧草种子 .....  | 21 |

|                       |      |
|-----------------------|------|
| D组：豆类 .....           | 23   |
| E组：豆类以外的双子叶植物种子 ..... | 27   |
| 5.彩色图版 .....          | 37页后 |
| 十、农作物种子四唑测定方法简表 ..... | 30   |
| 专业名词注解 .....          | 36   |

# 引 言

四唑测定已发展成为快速测定种子生活力的手段。这种测定对于便利种子收购和处理、休眠种子的检验、种子管理工作的初步检查、若干批种子生活力的评定、补充发芽试验以及种子变质原因的诊断等方面是有用的。

本手册是为了适应种子四唑测定需要一套统一的指导提纲而编写的。编写时，作者假定从事检验人员对种子检验的操作技巧和科学原理都已熟悉，这些内容在美国种子检验协会的种子检验规程、国际种子检验规程和第 30 号手册，以及由美国农业部颁发的农业和蔬菜种子检验规程等书中举有实例说明。为了进一步了解四唑测定，读者可参阅书末所列举的参考书目录。

## 一、种子来源

如果测定结果要能代表全批种子的生活力，那末对于送验种子必须按照仔细的取样程序来取得。因为在一批种子里常常存在着差异，混合样品应从若干均匀分布的部位扦取样品经混和后而取得。对于袋装和大量散装的自由流动种子可用扦样器取样，对于不流动的种子可徒手取得具有代表性的

种子。

种子检验规程第一部分关于净度和发芽试验扦样的详细说明也同样适用于四唑测定。

## 二、种子数目

每次最少测定 200 粒种子，每个重复 100 粒或少于 100 粒。种子应随机取得，并在处理前数好各重复种子。四唑测定的重复可少于发芽试验，因为由于水分、温度、光、菌类和其他环境因子可能引起的结果误差较少。对于染色准备非常困难，或报告要求不太严格的情况下，则检验的种子少于 200 粒可能是实用的。

## 三、设 备

若不会影响四唑测定的结果，则可以应用不同的设备。对设备项目的选择往往取决于个人的所好和是否容易得到。合适的试验设备实际例子包括：

1. 染色盆：表面玻璃可供牧草、三叶草和其他小粒种子染色用；培养皿和 200—250 毫升的烧杯可供玉米和菜豆等大粒种子染色用。

2. 切割和刺穿装置：单面刀片是切开种子的良好工具，因它价廉、锐利而使用方便。有时可用锋利的解剖刀。尖锐的缝衣针或解剖针亦适于刺穿用。

3. 镊子：供钳取种子用。

4. 放大仪器：检验小粒种子最好用立体显微镜，而合适的扩大镜对大粒种子也能达到满意的放大效果。

5. 医用滴瓶：测定结束后，用以吸去四唑溶液。

6. 配药瓶：供滴加乳酸苯酚溶液用。

7. 小针：矛式尖头针或细挑针，以供鉴定时对种子挑刺用。

8. 预措物品：发芽吸水纸、滤纸、纸巾。四唑测定放在真空高温（大约45℃）条件下可加速染色反应。实行这项工作的设备商店里有供应。

## 四、溶 液

### 1. 四唑溶液

建议采用的四唑药品为2,3,5—三苯基四唑氯化物(TTC)，可从化工商店购买。

四唑溶液可应用几种不同的浓度，其结果相仿。为方便起见，通常可配成1.0%和0.1%的溶液保存。1.0%溶液可用于不切开胚的种子染色，而0.1%溶液可用于已经切开胚的种子染色。有时用其它低浓度（如0.2%和0.5%）的溶液，代替0.1%溶液。

配制1.0%溶液，可将1克四唑药粉溶解于100毫升蒸馏水或自来水中。配制0.5%溶液则可将一份1.0%溶液与一份水混合，或将1克四唑药粉溶解于200毫升水中。配制0.1%溶液将一份1.0%溶液与九份水混合，或将1克四唑药粉溶解于1000毫升水中。

为获得最好的染色效果,溶液的 pH 值应调节到 6—8 之间。有时一批四唑药品配成溶液的 pH 低到 4 或更低。这种高酸度的溶液不能使种子适当地染色。

如果水的酸碱度不在中性范围内,那末四唑盐应溶解在磷酸盐缓冲液中。其缓冲液的配制如下:

溶液(1)——在 1000 毫升水中溶解 9.078 克  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

溶液(2)——在 1000 毫升水中溶解 11.876 克  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

取溶液(1) 400 毫升及溶液(2) 600 毫升混和在一起。将 10 克四唑盐溶解于按上法配制的 1 公升缓冲液中,即得到 pH7.0 的 1.0% 四唑溶液。

须将配好的溶液贮存在黑暗处或棕色瓶里,以免照光而变质。这种溶液可在室温里保存几个月,一般这种溶液每次用过后即作废。

## 2. 乳酸苯酚溶液

乳酸苯酚溶液,含有 20 份乳酸、20 份苯酚、40 份甘油和 20 份水。用于辨清某些牧草种子(如牧场早熟禾和梯牧草),透过外、内稃,看清胚的染色部分。这种溶液装在医用滴瓶或小塑料滴瓶中使用方便。

注意:乳酸苯酚有毒,不能接触或吸入。避免触及皮肤,并保持通风,以降低其在空气中的浓度。

## 五、温 度

在 20—45°C (68—113°F) 的温度下,并不影响四唑测定的正确性,但温度较高,可以加速染色进程。在室温进行

测定也可取得良好的效果。若希望缩短测定时间,可放在30℃或35℃(86°或95°F)发芽器,或其他加温器具里进行加温。但所用温度不能超过45℃。根据一般经验,在30℃染色比20℃快一倍,40℃(104°F)比30℃快一倍。

## 六、光

染色可在柔和光或黑暗中进行,但是光对四唑测定影响较小,可视为与结果正确性无关的因素。

## 七、测定种子的准备

### 1. 预措

种子在切开或挑破前,放水中浸软使染色图样易于鉴定。这期间发芽过程已开始,组织稍变柔软。

在种子准备切开前,将其放在潮湿的吸水纸上面或两层吸水纸或纸巾之间经过一夜,或将种子放在烧杯中用水浸3—4小时,保持温暖(30℃)。当种子充分吸胀,相当柔软而能通过胚部切取光洁薄片时即可。一般浸过一夜的方法与种子实验室的日常工作较为适合。水中浸泡是比较快的方法,并适宜在田间测定。但干燥易碎的种子,特别是菜豆,直接放于水中可能会破损。选用的预措方法取决于所要求的速度和正确性以及种子的特征。

小粒豆类种子和某些其它种类种子就不需这种预措而可直接放入四唑溶液。

如果时间紧迫，象牧草和禾谷类种子就无须经预措而可切开和染色。尽管由于切开手术不好，以及胚的破碎和溃坏而常常增加鉴定的困难，但仍可能很好地测定种子生活力。

经大量杀菌剂处理过的种子，在预措前要进行冲洗，以免红色染料蒙盖住四唑染色图样。

## 2. 染色准备

种子进行染色，必须使四唑溶液能与胚接触。禾本科牧草种子的果皮不能渗透四唑溶液，因此须将果皮切开或挑破。四唑能渗入的小粒豆类种子种皮，就不需预先准备。有些其它种类种子具有较厚和坚韧的种皮，必须在染色前除去。

种子的预措和染色准备一般可采用下列方法之一：

方法 1：纵向剖开（玉米、高粱、小粒谷类、大粒禾本科牧草种子）

将种子放进折好的潮湿吸水纸之间过夜，或在温水中浸泡 3—4 小时。染色前将种子放在吸水纸上，用锋利的刀片将种子纵向切开，使胚的主要构造露出（图 1）。取种子的一半供测定用，立刻用刀片、镊子或手指将种子从吸水纸移入溶液中，以免种子干燥。

方法 2：横向切开（小粒禾本科牧草种子）

将种子放在潮湿的吸水纸或滤纸上面过夜，然后将放在纸上的种子，用锋利的刀片，把颖果的中部靠近胚的上方横切成两断（图 2），弃去种子的顶部再用切片的一角将种子带胚一端移入四唑溶液。

方法 3：用针刺破（小粒禾本科牧草种子）

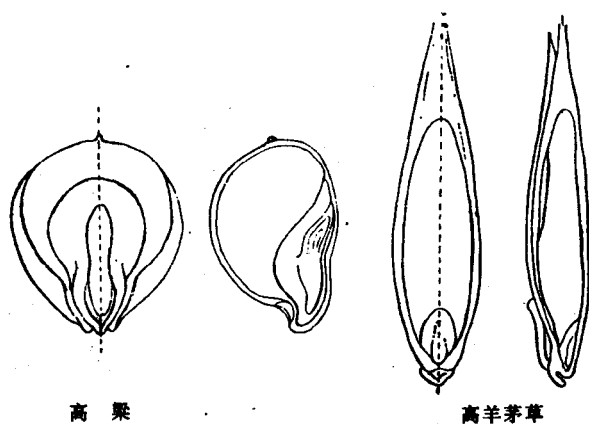


图 1 种子纵切

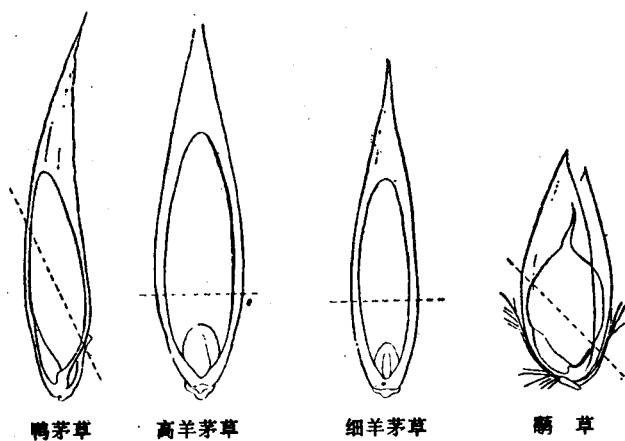
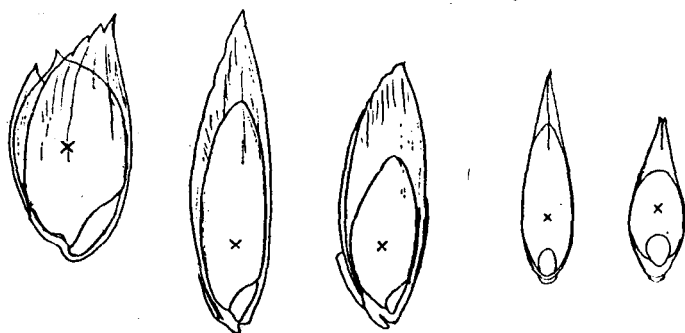


图 2 种子横切

预措是将种子放在潮湿吸水纸或滤纸上面经过一夜，然后用针刺破果皮穿进种胚附近的胚乳，而不使种胚损伤，再用针尖将种子从吸水纸移入溶液。



梯牧草

牧场早熟禾

小糠草

图3 用针刺入胚乳

方法4：剥去种皮（四唑不能透入种皮的双子叶植物）

预措是将种子放在潮湿巾卷里，或折叠的吸水纸之间过夜。或将种子放在温水中浸泡3—4小时。准备染色时，用镊子、针、刀片、指甲或其他适当的方法剥去种皮。花生种皮可以从尖端向上提起，按螺旋式扯去。棉花种皮可纵向切开剥去，使胚露出。最适当的方法可从经验和实践中得到启示。

棉花的子叶上披有一层薄膜，即使剥去种皮仍妨碍染色。这层薄膜容易除去，只要放在水中多浸30分钟，再放在大拇指与食指之间轻搓一下就可能脱出。

方法5：只须预措（大粒豆类种子）

大豆和其他大粒豆类种子当直接浸入水或四唑溶液里就很快而不一致地吸胀，以致常常引起种皮破裂、子叶脱开、胚轴折伤，或其他的损害。妥善的方法是在染色前将那些种子放在潮湿纸巾里过夜，使缓慢地吸湿，而不损伤种子。染色时间可通过刺破或切开种皮而缩短。

### 方法 6：无须预措或准备（小粒豆类种子）

这些种子的种皮不经处理，就能渗入四唑溶液，而且胚能很好染色，因此仅需将未受损伤的种子直接放入四唑溶液即可。如想了解发芽试验所要求的硬实百分率，那么，种子须经预措，即把种子放在保持20℃的潮湿吸水纸之间过夜，然后在35℃下染色3—4小时。如果想要测定硬实的生活力，应先将种皮刺穿或弄破，再进行预措。

## 八、染色

种子可放在小的玻璃或塑料容器（如培养皿、表面玻璃、烧杯）里染色。对大粒种子需有充足的溶液浸没种子，以供种子吸收。

根据实践经验，未经切开胚的豆类、棉花和禾谷类牧草种子，可用1.0%浓度的溶液。而对于切开胚的禾谷类牧草和谷类种子则用较稀的溶液（0.1—0.25%）。

各类作物种子染色所需的时间已在后面的农作物种子四唑测定方法简表中专列一栏。但这些时间不是绝对的，可根据种子的具体情况以及四唑溶液浓度和温度而变化。当有经验时，就有可能在染色的较早阶段进行鉴定。注意不要让种子染色过久，造成模糊的结果，使鉴定困难而不可靠。

## 九、四唑测定的鉴定

### 1. 鉴定准备

种子染色结束后立即进行鉴定，这时须吸去大部分四唑溶液。如果是小粒种子，可用医用滴瓶吸去，但应留小量溶液，以防种子干燥。如果种子在几小时内不进行鉴定，则须用水替换四唑溶液，并把种子放在低温下保存。

小粒禾谷类牧草种子染色后，加适量乳酸苯酚洗液，则易于鉴定。这种溶液能使种壳变为透明，并使染色的胚相当明显，便于鉴定。清洗种子时，首先用滴瓶吸去四唑溶液，再用小方形的吸水纸吸去剩余液体，然后加乳酸苯酚液冲洗。

牧场早熟禾种子每 100 粒用 2—3 滴乳酸苯酚液就已足够。牧场早熟禾种壳经 30 分钟就变为透明，梯牧草只需 10 分钟。

小粒种子须放在立体显微镜下检查。简便的方法是把种子留在染色盆里，用矛式针、细挑针或镊子把种子分为有发芽力和无发芽力两组。大粒种子不须在显微镜下检查，但稍加放大，通常是有帮助的。

豆类种子通常必须在检查前将种皮剥去。这工作最好是用镊子、细挑针或指甲来完成。要当心，不要折断胚根和对种子造成其他损伤。小粒豆类种子（如三叶草和紫苜蓿）可用乳酸苯酚液洗净，不必剥去种皮，就可放透射光下检查。

## 2. 鉴定的一般知识

四唑测定的正确鉴定取决于下列几点：

- (1) 种子和幼苗构造及种子发芽的知识。
- (2) 对测定的机理及其界线的了解。
- (3) 染色图样与其他可见的种子品质状况的综合鉴

定。

#### (4) 同发芽试验比较的经验。

当氢从活细胞呼吸过程放出来与吸进的 四唑溶液 结合后，使四唑测定显示出正常的红色。健全胚组织吸收四唑缓慢，所显示的颜色比压伤、衰老、受冻或受其他损害的胚的颜色要淡而鲜明。坚固健全而未显现红色的组织和已经染色组织间按一定规律形成等级，这表明，四唑尚未渗入并非是组织已死的表现。颜色深度从种子表面到组织内部逐渐变淡是表明四唑吸收缓慢。在正常染色的坚固组织与白色松软组织之间颜色有明显的变化。那就是不染色组织已死的证据。

当鉴定一次测定结果时，颜色仅仅是许多必须仔细观察的因素之一。组织的肿胀、压伤、虫蛀等等必须注意。种子的各部分也要象种子整体一样作为鉴定的基础来看待。只要在重要部位有一点受伤，或一个很小而位置很深的死亡、损坏、残缺，如胚根和子叶的着生点，那末就会使一颗原来是健全的种子变成没有发芽力的种子。

剖开玉米、禾本科牧草和小粒谷类有生活力的胚，其根梢中轴卷曲和伸长可作为有生活力的形态学指标。种子在液体里几小时后，由于发芽过程开始，根梢中轴伸长，而没有生活力的种子根梢中轴在同样情况下仍是平直的。

检验人员必须熟悉胚部细胞分裂的区。在禾本科牧草中，这些分裂区的部位，包括胚根和种子根尖端以及胚芽基部。如果死的分裂区，包括中胚轴和种子根，则胚就不能发育成幼苗。小麦和黑麦的胚根鞘尖端常常受损伤而死亡。高水分脱粒玉米，其盾片的上端和下端往往不能染色。这些症状并