

种子生活力测定原理和方法

Principles and Methods of Seed Viability Test

胡 晋 李永平 胡伟民 颜启传 主编



 中国农业出版社

种子生活力测定 原理和方法

**Principles and Methods of
Seed Viability Test**

胡 晋 李永平 主编
胡伟民 颜启传

中 国 农 业 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

种子生活力测定原理和方法/胡晋等主编. —北京: 中国农业出版社, 2009. 10

ISBN 978-7-109-13551-2

I. 种… II. 胡… III. 种子—作物—生活力—测定
IV. S330.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 167183 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100125)

责任编辑 徐建华

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2009 年 11 月第 1 版 2009 年 11 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 13.75

字数: 308 千字 印数: 1~1500 册

定价: 50.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

编著委员会成员

主 编：胡 晋 李永平 胡伟民 颜启传

副 主 编：马文广 丰作成 施文娟 邵美红 高 翔 彭锁堂
查春宏

参编人员：（以姓氏笔画为序）

马文广 丰作成 文江蓉 关亚静 刘宏友 池洁如
李永平 邵美红 郑昀晔 施文娟 查春宏 胡伟民
胡 晋 耿宏勇 高 翔 彭锁堂 颜启传

各章节编写人员：

第一章：胡 晋 施文娟 彭锁堂 李永平
第二章：李永平 马文广 刘宏友 文江蓉
第三章：胡伟民 邵美红 关亚静 郑昀晔
第四章：颜启传 高 翔 郑昀晔 丰作成
第五章：胡 晋 彭锁堂 查春宏 池洁如
第六章：丰作成 邵美红 郑昀晔 胡 晋
第七章：胡伟民 胡 晋 马文广 颜启传
第八章：马文广 施文娟 颜启传 耿宏勇
第九章：李永平 胡伟民 颜启传 刘宏友
第十章：施文娟 高 翔 查春宏 关亚静
第十一章：邵美红 彭锁堂 池洁如 查春宏
第十二章：彭锁堂 颜启传 耿宏勇 文江蓉
附录：颜启传



前言

言

oooooooooooooooooooo

种子在农业生产中起着重要的作用。种子生活力 (seed viability) 通常是指种子的潜在发芽能力或具有的生命力。许多种类的植物种子具有休眠特性, 即使给予最适的发芽条件, 全部或部分种子仍不能正常发芽。处于休眠状态的种子仍具有正常的生理生化代谢特征。因此, 人们可利用不同的种子生活力测定方法, 来显现休眠种子的生命现象和生活力的强弱, 并判断其长成正常幼苗和植株的潜在能力, 以表明其生理质量。国际种子检验协会 (ISTA) 把四唑染色法、X-射线测定法和离体胚测定法分别列入国际种子检验规程第 6、14、15 章, 作为种子生活力的测定方法。ISTA《乔灌木种子手册》将四唑染色法、酸性靛蓝染色法和 X-射线种子造影法编入其中, 作为林木休眠种子生活力测定的方法。美国和加拿大等国还将过氧化氢快速测定作为种子生活力测定方法。我国农作物种子检验规程、林木种子检验规程也将生活力测定的四唑染色法列入其中。种子生活力测定不仅在种子质量检测中被作为官方正式方法加以应用, 而且在种子生理等研究中对探明种子劣变衰老生理过程和查明种子衰老死亡原因也是非常有用的方法。因此, 了解种子生活力测定原理, 熟练掌握各种生活力测定方法, 对合理选用适宜有效的测定方法, 正确测定不同种类种子的生活力有着重要的意义。

本书收集了国内外有关种子生活力测定的权威手册和研究资料, 结合作者的实践编写而成。全书内容分为种子生活力测定的目的和意义, 种子生活力测定的基础知识, 四唑测定原理和特点, 四唑测定的仪器设备和化学试剂, 四唑测定程序、技术说明及影响因素, Vitascope 生活力测定仪, 农业和园艺种子四唑测定程序和鉴定标准, 乔灌木种子四唑测定程序和鉴定标准, 软 X-射线造影测定, 离体胚测定, 酸性靛蓝染色法和过氧化氢测定法等 12 章。为便于学习, 在附录增添名词术语。该书全面介绍了目前国内外种子生活力测定的研究和方法, 是一本内容全面、方法先进、技术实用的种子生活力测定参考书。本书可供全国种子科技人员学习使用, 也可供高等农业院校师

生和科研人员学习参考，同时也可作为种子科学专业的教学参考书。对本书所引用的资料尽可能列出了参考文献作者，但难免会挂一漏万，在此致以谢意。

由于编写时间仓促，书中难免存在不足之处，恳请读者批评指正。

编 者

2009 年 4 月于杭州华家池



第一章 种子生活力测定的目的和意义 1

第二章 种子生活力测定的基础知识 9

第三章 四唑测定原理和特点 23

• 1 •

第二节 四唑盐的种类	24
一、四氮唑的理化性质	24
二、碘硝基四唑	24
三、新四唑	25
四、蓝四氮唑	25
第三节 四唑测定原理	25
第四节 种子生活力强弱与四唑显色的关系	26
第五节 四唑测定的特点	27
一、原理可靠	27
二、结果准确	27
三、不受休眠限制	27
四、方法简便	27
五、省时快速	27
六、成本低廉	27
七、适用范围广	28
第六节 适用种子种类	28
一、官方正式使用	28
二、非官方正式使用	28
参考文献	28
第四章 四唑测定的仪器设备和化学试剂	29
第一节 仪器设备	29
第二节 实验室布置	32
第三节 四唑测定的化学试剂	32
一、四唑染色溶液	33
二、磷酸缓冲液	33
三、乳酸苯酚透明液	33
四、过氧化氢溶液	34
五、杀菌剂和抗生素	34
六、胶液硬化剂	34
参考文献	34
第五章 四唑测定程序与技术说明及影响因素	35
第一节 种子来源和样品数量	35
一、种子来源	35
二、试验样品的数量	35
三、数取试验样品的方法	36
第二节 四唑测定一般程序	36
一、染色前的预措预湿（预处理）	36
二、染色前的样品准备（暴露组织）	37

三、四唑染色	39
四、鉴定前处理	41
五、观察鉴定	42
六、结果计算和报告	44
第三节 四唑测定技术的说明	50
一、预湿前附加处理	50
二、预湿技术	51
三、样品准备技术	51
四、鉴定前样品处理技术	53
五、鉴定技术细则	53
六、注意事项	55
第四节 四唑测定的影响因素	55
一、四唑溶液浓度和 pH	56
二、温度和时间	56
三、光线	56
四、种子原始水分	57
五、样品的预湿和吸胀程度	57
六、样品准备的正确性和适合性	57
七、种子的损伤	57
参考文献	58
第六章 Vitascope 生活力速测仪	59
第一节 仪器构造	59
第二节 快速测定原理	59
第三节 使用技术	59
一、四唑溶液浓度	59
二、种子切开器使用方法	61
三、样品夹使用方法	61
四、仪器的安装和调试	61
第四节 种子测定方法步骤	62
第五节 有关说明	63
一、仪器安全使用注意事项	63
二、快速省时测定须知	64
三、极干燥种子样品的特殊处理	64
四、正确测定注意事项	64
第六节 保养技术与故障排除	65
一、保养技术	65
二、故障排除	65
参考文献	66
第七章 农业和园艺种子四唑测定程序和鉴定标准	67
第一节 农业和园艺种子四唑测定程序简表	67

第二节 农业和园艺种子四唑测定准备和鉴定指南	67
一、准备指南	67
二、禾谷类四唑染色图谱的鉴定指导	67
三、农业和园艺种子四唑测定图解	78
第三节 烟草种子生活力四唑测定方法	117
一、烟草种子形态构造及其生理活性	117
二、ISTA 四唑测定手册的烟草种子测定方法	119
三、美国俄勒冈州立大学种子实验室的烟草种子四唑测定程序	120
四、实用经验	120
参考文献	122
第八章 乔灌木种子四唑测定程序和鉴定标准	123
第一节 乔灌木种子四唑测定程序	123
第二节 乔灌木种子四唑测定的准备和鉴定	133
一、准备图示说明	133
二、乔灌木种子四唑测定准备和鉴定参照图谱	133
参考文献	135
第九章 软 X-射线造影测定	136
第一节 目的和发展简况	136
一、目的	136
二、发展简况	136
第二节 软 X-射线技术在种子上的应用	137
一、软 X-射线技术在种子上的应用和特点	137
二、软 X-射线种子造影的特点	139
第三节 X-射线的发生和性质	139
一、X-射线管的构造	139
二、X-射线的性质	140
三、X-射线机构造	141
四、有关调控参数	143
第四节 应用软 X-射线种子造影的原理	145
一、种子直接（不渗透造影剂或衬比剂）造影原理	145
二、种子衬比造影原理	146
第五节 软 X-射线种子渗透造影的最佳条件	148
一、最佳氯化钡浓度和渗透时间的选择	148
二、最佳曝光条件的选择	149
第六节 X-射线种子造影方法	150
一、种子直接造影法	150
二、种子衬比造影法	150
第七节 软 X-射线仪的使用技术	152

一、仪器的安装和检查	153
二、仪器的调试	153
三、仪器的使用方法和拍摄技术	154
四、暗室技术	155
五、X-射线仪使用注意事项	156
参考文献	157
第十章 离体胚测定	158
第一节 概述	158
一、引言	158
二、离体胚测定的理论基础	158
三、活种子和死种子形态组织特征及生理特性的差异	159
第二节 离体胚测定的设备	160
一、林果树种子剥离胚的工具	160
二、剖切林果树种子种皮和胚乳的解剖刀和刀片	160
三、其他设备	161
第三节 ISTA 规程有关生活力的离体胚测定	161
第四节 ISTA 规程生活力的离体胚测定细则	162
第五节 ISTA 乔灌木种子手册离体胚测定的鉴定标准和实例	164
一、活胚和无生活力胚的鉴定标准	164
二、鉴定实例	164
参考文献	167
第十一章 酸性靛蓝染色法	168
第一节 概述	168
一、引言	168
二、发展简史	168
第二节 酸性靛蓝染色测定的原理和适用范围	170
一、酸性靛蓝的化学性质	170
二、测定原理	170
三、酸性靛蓝染色测定的鉴定参考标准	172
四、适用范围	173
第三节 酸性靛蓝染色测定程序	177
一、酸性靛蓝染色液的适用浓度和配制方法	177
二、试验样品和种子预处理	177
三、试剂染色	179
四、生活力鉴定	180
五、结果计算和报告	180
第四节 农业和林果种子酸性靛蓝染色鉴定实例	181
参考文献	194

第十二章 过氧化氢测定法	195
第一节 概述	195
第二节 一般测定程序	196
一、种子浸渍	196
二、种子切开	197
三、切开种子的培养	197
四、检测	197
五、注意事项	198
参考文献	199
附录 名词术语	200

□ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □

优质的潜在能力。从上述定义可知,种子生活力通常是指休眠种子的潜在发芽能力;种子发芽力是指非休眠种子在适宜条件下长成正常幼苗的能力;种子活力是指在逆境条件下快速发芽,健壮生长成正常植株的潜在能力。

《国际种子检验规程》指出,在下列 6 种情况下,如果鉴定正确,生活力测定和发芽率测定的结果基本是一致的,即种子生活力和发芽百分率没有明显的差异:①无休眠、无硬实或通过适宜的预处理破除了休眠和硬实;②没有感染或已经过适宜的清洁处理;③在加工时未受到不利条件或贮藏期间未用有害化学药品处理;④尚未发生萌芽;⑤在正常或延长的发芽试验中未发生劣变;⑥发芽试验是在适宜的条件下进行的。

从种子生理角度分析,由于种子生活力测定的过程不能直接观察到种子生长的全部特征,则可能造成误判为高生活力的种子,而实际上是发芽力和活力低的种子;而劣变较轻的种子,在适宜条件下测定的发芽力较高,但在逆境条件下测定的活力则较低。活力对劣变的发生更为敏感,活力的变化先于生活力的变化,只有活力变化到一定程度时,生活力的变化才能表现出来。这也表明这三者的概念是不同的。因此,ISTA 种子检验规程分别将三个测定项目分为三章,种子发芽力测定列为第 5 章发芽试验,种子生活力测定列入第 6 章种子生活力的生物化学测定;种子活力测定列入第 15 章种子活力测定。

从种子活力角度分析,这三者仍存在相互关系。从四唑染色的程度分析,种子胚的主要构造和有关营养组织全部染成正常新鲜亮红色的为高活力种子;部分染色,颜色暗红,组织软化的,为低活力种子;胚的主要构造不染色,呈灰白色或粉红色,组织软腐的为无生活力,无发芽力,无活力的种子。因此,可以利用四唑染色分级方法测定种子活力,并可利用四唑染色解剖图形法分析种子发芽力异常的原因。在发芽测定中,健壮幼苗百分率高的样品,其活力也强,而发芽缓慢,畸形幼苗多的样品,其活力必然低。所以,在种子质量检测 and 种子劣变过程研究中,全面了解种子生活力、发芽力和活力的特性及其相互关系,才能正确判断种子的内在质量,采用合理的加工处理技术,达到种子的最大利用价值。

第二节 种子生活力测定方法的分类

一、种子生活力测定方法的分类

种子生活力测定方法可分为直接测定法和间接测定法两大类。

直接测定法是指预先利用破除休眠处理使种子解除休眠,然后进行发芽试验,测定发芽力的方法,如硝酸处理和硝酸钾发芽法、赤霉酸处理发芽法、预先洗涤处理发芽法等。这类方法已在 ISTA 种子检验规程和我国种子检验规程中有详细说明,本书不再重复介绍。本书主要介绍间接测定法。

二、生活力间接测定法的分类

根据间接测定法的原理和特点,又可将其分为生物化学测定法、物理特性测定法、种

子生长迹象测定法三类:

(一) 生物化学测定法

这类方法是根据死、活种子生理生化特性的差异,利用生化显色指示剂进行染色,然后按染色特征鉴定种子生活力。按其显色原理的不同,又可将其分为两类:

1. 酶促反应显色法

(1) **四唑染色法** 利用生化显色指示剂 2, 3, 5-三苯氯化四唑试剂与种子组织发生生化反应,有生活力组织的脱氢酶可使无色的四唑还原成红色、稳定的三苯基甲腈而显现出死、活组织颜色的差异,完全死组织则完全不染色(白色)。据此可根据种子染色的程度判断种子的生活力和分析种子发芽异常的原因。该法被列入 ISTA 种子检验规程和我国种子检验规程,是目前广泛应用的种子生活力测定的最重要的方法。

(2) **溴麝香草酚蓝(BTB)法** 种子组织活细胞必然进行呼吸作用,吸收 O_2 , 放出 CO_2 , 当 CO_2 溶于水中生成 H_2CO_3 , 可解离成 H^+ 和 HCO_3^- , 使种子胚周围环境的酸度增加。利用溴麝香草酚蓝试剂测定酸度的变化,从而可测定种子的生活力。具体方法是:首先配制 0.1%BTB 琼脂凝胶培养皿,然后取经浸种激活酶的种子样品,将种子胚部向下整齐地插入准备好的 BTB 琼脂凝胶中,种子间距至少 1cm,并将培养皿置于 $30\sim 40^\circ C$ 下保温培养 1~2h,然后在蓝色背景下进行观察鉴定种子生活力。如种胚附近呈现深黄色晕圈的为活种子,否则是死种子。这种方法对种子生活力测定准确性不够,手续麻烦,没有实用价值。

(3) **碘化钾显色法** 某些种子(松属、云杉属和落叶松属)在发芽过程中,胚内会形成和积累淀粉。这种淀粉在碘化钾试剂作用下产生蓝色反应,从而可根据胚中产生蓝色反应的程度来判断种子生活力的强弱。

测定方法:

①配制碘-碘化钾溶液:把 1.3g 碘化钾溶解在水中,再加入 0.3g 结晶碘,然后定容至 100ml。

②将种子在水中浸泡 18h。

③取出种子,放在垫有湿滤纸的培养皿内,将培养皿置于 $30^\circ C$ 恒温箱中。松和云杉种子放 48h,落叶松种子放 72h。

④用刀片把胚部切下,然后浸入碘-碘化钾溶液中 $20\sim 30min$,取出胚用水冲洗 12min,然后在垫有白纸的玻璃板上进行观察。

⑤鉴别种子生活力的标准 有生活力种子的胚部全部染成不同程度的黑色至灰色,或者胚根部呈褐色,子叶为黄色。无生活力种子的胚部全部染成黄色,或子叶呈灰色或黑色,胚根呈黄色,或胚根末端呈黑色或灰色,而其他部分呈黄色。

此法适于松属、云杉属和落叶松属种子生活力的测定,但其准确性不够,实用性不大。

(4) **硒酸氢钠($NaHSeO_3$)染色法** 种子活组织具有呼吸作用,能将硒酸氢钠还原成红色,活组织染成红色,而死组织则不染色,据此可测定种子生活力。1939 年中国研究人员郝景盛在德国对酸性靛蓝染色法与硒酸氢钠染色法测定种子生活力进行了比较研究,结果认为与发芽试验结果具有非常良好的相关。但由于硒盐具有毒性,没有得到普遍应用。

(5) **二硝基苯染色法** 该法由前苏联顾列维奇(1937)发明。种子活细胞在呼吸过程中能把渗入种子内的二硝基苯,在氨的作用下还原成绛红色产物。有生活力种子胚根染成深绛红色。其胚根的表层和内层颜色最深、呈紫绛红色的环状,而没有生活力的死胚,则胚根不染色,借此可测定种子生活力。该法仅适用于测定禾谷类种子(如小麦、大麦、黑麦、燕麦)生活力,手续麻烦,试剂具有毒性,没有实用价值。

2. 细胞生理特性测定法

(1) **利用细胞透性测定法** 种子随着衰老死亡进程,原生质膜透性逐渐增加。特别死细胞原生质膜比活细胞原生质膜透性增加更明显。利用苯胺染料(如靛蓝、靛蓝胭脂红和红墨水等)试剂处理种子,苯胺染料容易透过死细胞原生质膜而显现颜色,而活细胞原生质膜不能透过则不着色,借此可测定种子生活力。该法测定结果比较准确,已编入 ISTA《Tree and Shrub Seed Handbook》,曾列入前苏联和东欧多个国家的种子检验规程。也是测定大粒农业、蔬菜、林木种子生活力的重要方法之一。

(2) **利用细胞质壁分离测定法** 如果细胞脱水会出现细胞质和细胞壁的分离,这是活细胞的生理学特性。种子活组织细胞会发生质壁分离,而死组织细胞则不会发生质壁分离现象。借助于硝酸钾与蔗糖配成的脱水剂,对载玻片上吸胀种子胚根表皮细胞薄片滴上脱水剂,然后盖上盖玻片,立即在高倍显微镜下观察,凡是发生质壁分离的,为活种子,凡不发生质壁分离的为死种子。

(二) 物理特性测定法

1. **软 X-射线测定法** 这类方法是根据种子厚度、密度、结构和死活组织生理特征的不同,在软 X-射线照射下所产生影像特征的差异,测定种子生活力。按其测定原理的不同,又可分为两类:

(1) **直接造影测定法** 一般具有生活力的种子,籽粒饱满完整,内容物充实,组织致密,无孔洞、不破裂、无损伤,在软-射线照射下,影像呈现深色、完整,饱满等有生活力种子的特征,而死种子则色浅、瘦小、畸形、破碎等图像,借此,则可测定种子生活力。

(2) **衬比造影测定法** 根据种子死、活细胞原生质选择透性的差异,利用能吸收软 x-射线的化学试剂,如 BaCl_2 、 AgNO_3 、 NaI 、 KI 等处理种子,种子的死组织容易渗入衬比剂(如 B^{++})离子,在软 X-射线照射下,渗入钡的死组织吸收了软 X-射线,则呈现黑色影像,而活组织不渗入 B^{++} 离子,则呈现浅色影像,按其活死组织造影特征的差异,就可测出种子生活力。该法已列入 ISTA 规程第 14 章和 ISTA《Tree and Shrub Seed Handbook》,也是种子生活力测定的重要方法之一。

2. **荧光测定法** 有些种子含有荧光物质(如某些黄酮类、香豆素类、酚类等物质),由于种子衰老死亡进程,细胞原生质透性增加,当切开种子或完整种子放在无荧光的白色滤纸上就可直接观察到死、活种子荧光的变化或外渗荧光特征和颜色的差异,进而测定种子生活力。具体方法可分为两种:

(1) **直接观察法** 该法适用于禾谷类、松柏类及某些蔷薇科果树种子生活力的鉴定,但种间的差异较大。

用刀片沿种子的中心线将种子切为两半,使其切面向上放在无荧光的白纸上,置于紫

外灯下照射并进行观察、记载。有生活力的种子在紫外光的照射下将产生明亮的蓝色、蓝紫色或蓝绿色的荧光；丧失生活力的死种子在紫外光照射下多呈黄色、褐色以至暗淡无光，并带有多种斑点。

随机选取待测种子样品，按上述方法进行观察并记载有生活力及丧失生活力的种子数目，然后计算有生活力种子所占百分数。

(2) 纸上荧光法 随机选取完整无损的种子样品，置烧杯内加蒸馏水浸泡 10~15min 让种子吸胀，然后将种子沥干，再按 0.5cm 的间距摆放在湿滤纸上（滤纸上水分不宜过多，防止荧光物质疏散），将培养皿覆盖静置数小时后将滤纸（或连同上面摆放的种子）风干（或用电吹风吹干）。置紫外灯下照射，可以看到摆过死种子的周围有一圈明亮的荧光团，而具有生活力的种子周围则无此现象。根据滤纸上显现的荧光团的数目就可以测出丧失生活力的种子数量，并由此计算出有生活力种子所占的百分率。

该法应用于白菜、萝卜等十字花科植物种子生活力的鉴定效果较好。

(三) 种子生长迹象测定法

1. 离体胚测定法 许多种类种子休眠或发芽缓慢是由于种皮、胚乳或配子体等组织紧密包围，而使种胚受到高浓度 CO_2 的抑制，得不到 O_2 的供应或受到发芽抑制物质的抑制而引起。如果从种子组织中分离出胚，就消除了种子休眠或发芽缓慢的原因，经适宜条件培养后就可观察到胚的生理特征。活的种胚会显现绿色，有生长迹象，保持新鲜组织状态，而死的种胚，则表现出异常特征，会变色，甚至腐坏，据此可测定种子生活力。该法已编入 ISTA 规程和 ISTA 《Tree and Shrub Seed Handbook》，是林木种子生活力的重要测定方法。

2. 过氧化氢浸培法 许多种子休眠是由于种子内 CO_2 浓度过高，缺少 O_2 供应引起。 H_2O_2 是一种不稳定的化合物，会分解为 H_2O 和 O_2 。当渗入种胚的 H_2O_2 很快会分解，然后放出氧气，供给胚，促进呼吸作用加强和胚的生长，活的胚得到 O_2 后表现出生长迹象，而死组织则没有这种生理表现，据此可测定种子生活力。

该法具有简单快速等特点。已编入加拿大《Quick Tests for Tree Seed Viability》(1988) 手册。

从上述各种种子生活力测定方法简介中可看出，迄今在种子生活力测定方法中，四唑染色法是列入 ISTA 种子检验规程并被全球公认的最好方法；X-射线测定和离体胚测定也是列入 ISTA 规程的重要方法；酸性靛蓝染色法是列入 ISTA 《Tree and Shrub Seed Handbook》和东欧国家普遍使用的方法；过氧化氢测定法是一种新发展的快速测定方法。因此，本书将对种子四唑染色和局部解剖图形四唑染色法作重点介绍，并分别依次编入 X-射线测定法、离体胚测定法、酸性靛蓝染色法和过氧化氢测定法等。

第三节 种子生活力测定的目的和应用

一、目的和价值

种子生活力测定在作物育种、种子生产、种子加工、种子收购、种子贮藏、种子调