

T.T.C 檢定方法에 의한 種子의 發芽力檢定에 관한 研究

全遇滂
國立農產物檢査所

Studies on the Seed's Germinability test by the T.T.C. testing method.

W.B. Jeon

National Agricultural Products Inspection Office (NAPIO)

Summary

In order to determine and to reduce the differences between biochemical test method for the seed viability with T.T.C. (2, 3, 5. Triphenyl tetrazolium Chloride) reagent and germinator method, the topographical diagram of red colored formazan was carried out in 15-16 parts differences.

From this resulted information, the classification of the typical staining reaction given for 3 species were derived into 3-4 parts for the germinable in normal seedling, the same as the following results.

1. Corn (*Graminaceae*)

- Entire embryo stained in bright red color.
- Both extremities of scutellum unstained
- Both extremities of scutllum, coleorhiza and non-critical portions of radicle unstained.

2. Soybean (*Leguminosae*)

- Seed completely stained in red color.
- Minor unstained areas on cotyledons.
- Extreme tip of radicle unstained; minor unstained areas on cotyledons

3. Radish (*Cruciferae*)

- Seed completely stained.
- Minor unstained areas on cotyledons.
- Outer cotyledon mostly unstained: inner cotyledon completely stained
- Extreme tip of radicle unstained: large portion of outer cotyledon unstained.

I. 緒論

人類는 農業이 發達하지 않았을 때에는 採集放浪生活을 하였으나 種子를 利用하면서 부터는 定着生活이 시작되었고, 定着되면서 養畜이며 農業과 文明이 始作되었다 할 수 있다.

農業의 發達は 種子를 改良시켜서 作物의 改良과 增産을 도모하였고 나아가서 優良牧草를 生産하여 家畜의 改良도 가져올 수 있었으므로 種子의 改良이 곧 農業發展에 根本이 되는 것임이 일찌기 인식되어 옛부터 種子改良에 관한 연구가 지속되어왔다. 種子를 改良하는데는 良質의 多收性品種을 얻기위한 育種上의 新品種育成, 退化防止를 위한 採種方法의 科學化, 性能좋은 種子를 使用하기 위한 取扱方法의 改善 등이 꾸준히 進行되어 왔다.

種子是 살아있는 어린植物體이다. 種子 그 自体상태로는 發芽하고 生長할 수 없으나 適當한 環境만 갖추어지면 언제라도 發芽하여 땅에 定着할 수 있는 어린뿌리와 함께 잎도 2~3枚가 分化되어 있으며 養分이 될 수 있는 要素들 그리고 固有의 種을 이어가는 遺傳的 特性이 간직되어 있는 神秘스러운 生命體이다. 이러한 種子를 農業生産의 原料로 使用하기 위하여 現代農業에서는 씨를 뿌리기전에 種子의 品位를 確認하고 있다. 即, 遺傳的 特性은 次代檢定으로 發芽率은 發芽試驗으로, 品位를 分析하여 整立率·病害粒·被害粒·異種穀粒·異品種·異物·雜草種子를 確認하는 檢査를 實施한다. 檢査項目中에서도 發芽率은 播種量 決定과 種苗의 健全度를 예측할 수 있는 것이므로 반드시 檢定되어야 하는데 發芽檢定 所有期日이 너무 오래 걸리므로 不便이 많다. 即, 벼는 5~14日間, 보리와 배추는 4~7日間, 유채씨는 3~14日間, 잔디씨는 10~28日間, 시금치는 7~21日間 所要된다.

種자에 관계하는 사람들은 種子의 發芽力을 短期間內에 檢定할 수 있는 方法을 研究하여 왔는데 着色法·酵素還元方法, 電氣傳導體, 胚切斷法,

X-線檢定法, 遊離脂肪酸檢定法 등이 研究開發되었으나 現在 國際적으로 公用되고 있는 것은 酵素還元方法인 TZ 檢定方法이다.

1901년 Waller¹⁾는 電氣傳導率檢定方法을 연구하여 죽은種子是 細胞膜이 느슨하여져서 물의 滲透가 용이하고, 細胞內容物質이 外部의 물에 녹아나와서 電氣의 傳導率이 높아진다고 보고 하였고, 1876년 Dimitrienicz는 種子를 黃酸에 침치하면 胚의 색깔이 죽은 것과 살아있는 것 간에 차이가 있었다고 하며, 1925년 Neljubow²⁾는 Indigo cormine 이 죽은 種子의 胚에만 浸透한다고 하며, 1933~1936년 長谷川^{3,4)}은 Sodium tellurate (Na_2TeO_4)와 Sodium Selenate (Na_2SeO_4)가 살아있는 종자의 胚를 靑藍色으로 着色시켰다고 하였다.

1941년 Kuhn 과 Jerchel⁵⁾은 Tetrazolium 塩 (2, 3, 5, Triphenyl tetrazolium chloride; $C_{15}ClN_4$)을 발견하고 살아있는 종자의 胚에서는 脫水素酵素에 의하여 赤色으로 還元物質이 生成된다고 처음 보고 하였으며, 1952년 Simth⁶⁾는 옥수수 種子에서 脫水素酵素인 Diphosphopyridine 과 Diaphorase 의 作用으로 還元作用을 한다고 하였고 이어서 xanthine oxidase 와 같은 好氣性 還元酵素도 관여한다고 보고하였다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

禾本科 : 옥수수 (황옥2호)

荳科 : 콩 (忠北白)

十字花科 : 무우씨 (時無大根)

2. 方法

가. 標準發芽 試驗方法

發芽試驗器方法에 依하였다.

袋紙 : TP

溫度 : 콩·옥수수는 25℃, 무우씨는 20℃로 恒溫

試驗期間：콩·옥수수는 7日間, 무우씨는 8日間

供試料：整粒種子로 100粒씩 4反覆
나. TZ 檢定方法

- ③ 胚盤下尖端 未染色(〃)
- ④ 胚盤上·下尖端 未染色(〃)
- ⑤ 胚盤兩尖端·幼根尖端 未染色(〃)
- ⑥ 胚盤 兩尖端·根鞘 幼根尖端 未染色(〃)

Method of TZ Test

Kind of Seed	Pretreatment		TZ Treatment		
	Temp.	Soaking Time	Concentration	Temp.	Staining Time
Soybean	30°C	6 hours	1.0%	35°C	4 hours
Corn	30°C	4	0.1	35°C	2
Radish	30°C	4	1.0	35°C	2

(1) TZ 溶液造劑；T. T. C. 粉末을 磷酸緩衝液(pH 7.0)으로 용해시켰고 試藥은 光線에 노출되면 赤色으로 변색되므로 褐色병에 검은종이로 피복상태에서 보관하였다.

(2) 콩；事前處理된 試料 中에서 無作爲抽出하여 果種皮가 피복상태로 약액에 浸漬시켰다.

(3) 옥수수；禾本科인 옥수수는 胚를 左右相稱이 되도록 切開하고 中 1쪽만을 供試料로 使用하고 다른 한쪽은 버렸다. 切開된 종자는 건조하지 않도록 切開와 동시에 약액에 침지하였다.

(4) 무우씨；TZ 溶液이 浸透할 수 있게 果種皮를 除去하였다.

(5) 染色誘導；TZ 용액의 量을 種子量의 2倍容量이 되도록 하였고, 소정의 온도가 유지된 恒溫器內에서 供試料作成이 完了된 後부터 소요시간 放置하였다.

(6) 鑑定方法；染色誘導 時間이 完了됨과 동시에 맑은 물로 3회세척후 페트리접시 內에서 물에 담긴 상태로 檢定하였다.

(7) 反覆區；100粒씩 2回

(8) 判定方法；

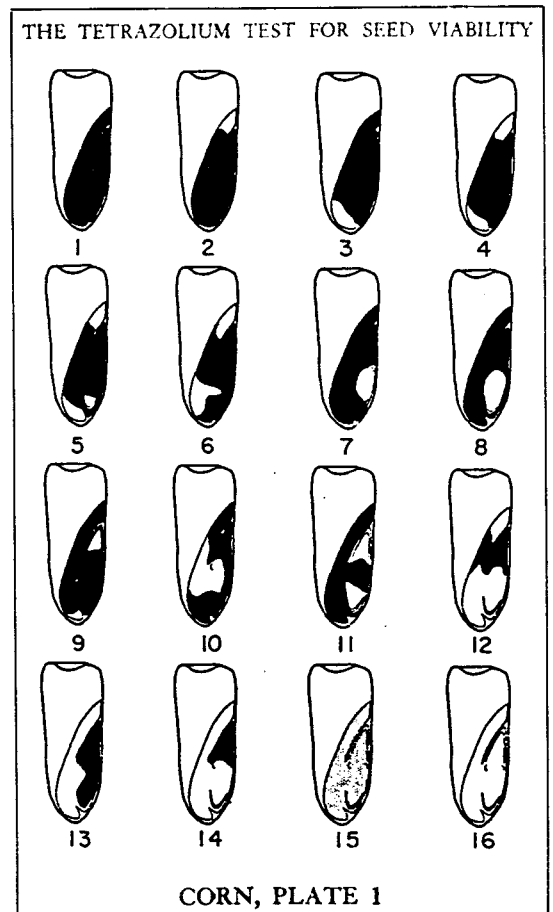
(가) 禾本科種子：옥수수(벼, 보리, 밀, 잔디 씨 등)

① 胚가 全部 染色(發芽可能)

② 胚盤上尖端 未染色(〃)

⑦ 胚軸部位 未染色(發芽不可能)

⑧ 幼根·胚軸 未染色(〃)



- ⑨ 幼芽 未染色(〃)
- ⑩ 胚軸 및 胚盤中央部 未染色(〃)
- ⑪ 幼芽·幼根 未染色(〃)
- ⑫ 胚盤下半部, 胚軸下部 未染色(〃)
- ⑬ 胚盤全部 未染色(〃)
- ⑭ 胚盤, 幼根, 胚軸 未染色(〃)
- ⑮ 胚 全體가 淡紅色으로 染色(〃)
- ⑯ 胚 全體가 未染色(〃)

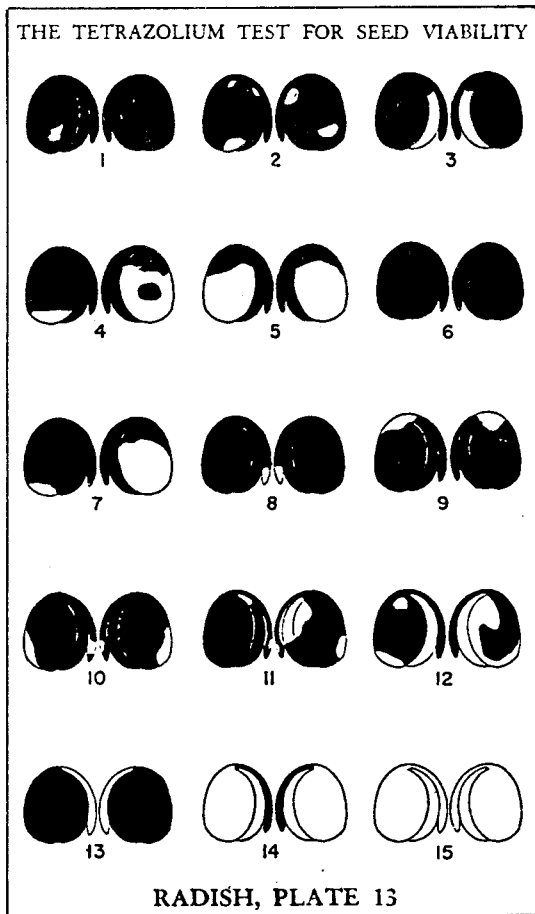
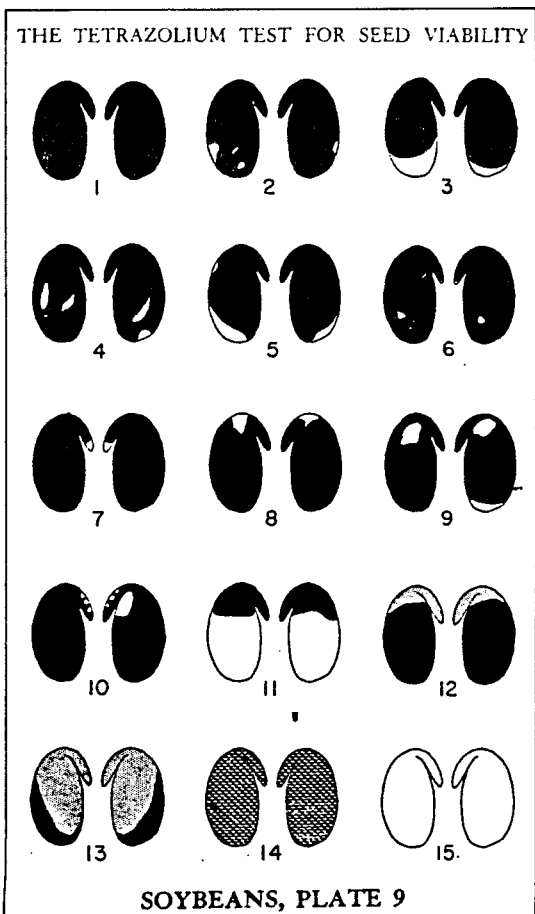
(나) 荳科 種子: 콩(팥·녹두·팥씨 등)

- ① 種子全部가 染色(發芽可能)
- ②-⑤ 子葉의 적은面積 未染色(〃)
- ⑥ 幼根尖端·子葉極小部分 未染色(〃)
- ⑦ 幼根 頂部 未染色(發芽不可能)
- ⑧ 幼根-胚軸의 연결부 未染色(〃)

- ⑨ 幼芽部分의 子葉 未染色(〃)
- ⑩ 胚軸·幼根의 上部가 斑點으로 未染色(〃)
- ⑪ 子葉의 上半以上部가 未染色(〃)
- ⑫ 子葉의 下部·幼根, 胚軸이 暗赤色 또는 淡赤色으로 未染色(〃)
- ⑬ 子葉 연변을 除한 部分이 淡赤色으로 染色(〃)
- ⑭ 子葉 全體가 淡赤色 또는 暗褐色으로 染色(〃)
- ⑮ 子葉 全體가 未染色(〃)

(다) 十字花科의 種子: 무우(배추·양배추 등)

- ① 種子全部가 染色(發芽可能)
- ②-④ 子葉의 작은面積 未染色(〃)
- ⑤ 外子葉 大部分 未染色, 內子葉全部染色(〃)



- ⑥ 幼根 尖端 未染色(%)
- ⑦ 幼根 尖端 未染色 外子葉 大部分 未染色(%)
- ⑧ 幼根 大部分 未染色(發芽不可能)
- ⑨ 幼根・胚軸이 子葉과 연접부위 未染色(%)
- ⑩ 幼根中間部 未染色, 外子部 一部 未染色(%)
- ⑪ 幼根一部와 子葉一部 未染色(%)
- ⑫ 內子葉 全部와 外子葉一部 未染色(%)
- ⑬ 幼根・胚軸 全部 未染色
- ⑭ 子葉全部 未染色(%)
- ⑮ 種子 全部가 未染色(%)

Ⅲ. 試驗結果 및 考察

1. 發芽器에 의한 發芽試驗結果

Result of Germination Test with Germinator

Kind of Seed	Normal Seedling	Abnormal Seedling	Non sprout	Germination Percentage
	%	%	%	%
Soybean	70	16	14	70± 1.5
Corn	91	8	1	91± 0.5
Radish	83	14	3	83± 1.0

2. TZ 檢定結果

Result of Germination Test with T.T.C.

Kind of seed	Germinable (%)							Non-Germinable (%)										Germination percentage	
	No 1	No 2	No 3	No 4	No 5	No 6	Subtotal	No 7	No 8	No 9	No 10	No 11	No 12	No 13	No 14	No 15	No 16		Subtotal
Soybean	55	9	1	2	3	2	72	3	4	1	3	3	2	1	3	8	-	28	72
Corn	81	3	1	1	2	3	91	2	1	1	1	0	1	2	1	0	0	9	91
Radish	70	6	2	1	3	4	86	2	4	1	1	3	1	1	1	0	-	14	86

o Soybean Seed.

- No. 1. GERMINABLE. Seed completely stained; stain not overly intense.
- Nos. 2-5. GERMINABLE. Minor unstained areas on cotyledons.
- No. 6. GERMINABLE. Extreme tip of radicle unstained; minor unstained areas on cotyledons.
- No. 7. NON-GERMINABLE. More than extreme tip of radicle unstained.
- No. 8. NON-GERMINABLE. Juncture of radicle-hypocotyl axis and cotyledons unstained.
- No. 9. NON-GERMINABLE. Unstained area in region where plumule is located.
- No. 10. NON-GERMINABLE. Series of unstained areas on upper portion of radicle-hypocotyl axis.

-
- No. 11. **NON-GERMINABLE.** More than one-half of upper end of cotyledons unstained.
 - No. 12. **NON-GERMINABLE.** Basal end of cotyledons and radicle-hypocotyl axis cloudy red or milky red in color; stain extends through entire cross-sectional area of cotyledons.
 - No. 13. **NON-GERMINABLE.** Same as No. 12 except milky-red areas are more extensive.
 - No. 14. **NON-GERMINABLE.** Seed stained deep purplish red; stain extends through entire cross-sectional area of cotyledons.
 - No. 15. **NON-GERMINABLE.** Seed completely unstained.

o Corn seed

- No. 1 **GERMINABLE.** Entire embryo stained bright red.
- Nos. 2-4. **GERMINABLE.** Extremities of scutellum unstained.
- Nos. 5-6. **GERMINABLE.** Extremities of scutellum unstained; non-critical portions of radical unstained.
- No. 7-8 **NON-GERMINABLE.** Area where seminal roots originate is unstained.
- No. 9. **NON-GERMINABLE.** Plumule unstained.
- No. 10. **NON-GERMINABLE.** Central portion of scutellum and area of seminal root development unstained.
- No. 11. **NON-GERMINABLE.** Plumule and radical unstained.
- No. 12. **NON-GERMINABLE.** Unstained area on lower scutellum and radicle extends into region where seminal roots develop.
- No. 13. **NON-GERMINABLE.** Scutellum entirely unstained.
- No. 14. **NON-GERMINABLE.** Scutellum and radicle unstained.
- No. 15. **NON-GERMINABLE.** Stain very faint pink.
- No. 16. **NON-GERMINABLE.** Entire embryo unstained.

o Radish Seed

- No. 1. **GERMINABLE.** Seed completely stained.
- Nos. 2-4. **GERMINABLE.** Non-critical, unstained areas on outer and inner cotyledons.
- No. 5. **GERMINABLE.** Outer cotyledon mostly unstained; inner cotyledon completely stained.
- No. 6. **GERMINABLE.** Extreme tip of radical unstained.
- No. 7. **GERMINABLE.** Extreme tip of radicle unstained; large portion of outer cotyledon unstained.
- No. 8. **NON-GERMINABLE.** More than extreme tip of radicle unstained.
- No. 9. **NON-GERMINABLE.** Juncture of cotyledons and radicle-hypocotyl axis unstained.
- No. 10. **NON-GERMINABLE.** Radicle almost entirely bisected by unstained band; minor unstained area on outer cotyledon.
- No. 11. **NON-GERMINABLE.** Several critical, unstained areas on radicle.
- No. 12. **NON-GERMINABLE.** Inner cotyledon entirely unstained and large portion of outer cotyledon unstained (more than half cotyledonary tissue unstained).
- No. 13. **NON-GERMINABLE.** Radicle-hypocotyl axis entirely unstained.
- No. 14. **NON-GERMINABLE.** Cotyledons entirely unstained.
- No. 15. **NON-GERMINABLE.** Seed completely unstained.

3. 考察

가. 標準發芽試驗方法과 TZ 檢定方法은 比較的 높은 相關性이 있으나, TZ 檢定方法에서 약간씩 높은 경향을 보여 주고 있는데 1947년 porter²¹는 콩에서 TZ 檢定방법이 4% 높았다고 하였고, 1953년 柳澤²²은 소나무 종자에서 5% 높았다고 한다.

나. TZ 檢定方法이 標準發芽試驗方法보다 높은 原因을 살펴보면 다음과 같다.

○ TZ 檢定方法에서는 非正常苗로 될 것도 染色되므로 判定에 오차를 가져올 수 있다. 即, 正常苗로 될 수 없는 弱勢種子도 TZ 에 染色될 수 있는 微量의 脫水素酵素를 갖고 있어 이것들이 染色되므로 오차가 발생된다.

○ 種子の 退化는 胚全体가 一時에 죽는 것이 아니고 어떤 1部位로부터 죽어가기 시작하므로 染色境界의 不明確과 切開位置에 따라 죽은 부위가 은폐될 수 있으므로 이에따른 오차가 생긴다.

다. 콩과 무우씨에서 發芽勢가 높은 活力種子是 染色이 表皮에서만 일어나나 묵은 弱勢種子에서는 子葉의 깊은곳까지 染色되므로 暗赤色으로 된다. 이것은 자엽내에 있는 脫水靑 酵素의 감소로 인하여 Formazan 形成(TTC 가 脫水素 酵素에 의하여 赤色으로 還元된 物質)이 약하기 때문에 일어나는 현상이다. 即, 活力이 강한 子葉에서는 表面가까이에서 두꺼운 Formazan 層을 이루므로 TTC 가 內部로 들어가는 양을 감소시켜주기 때문이다. 이 暗赤色과 鮮紅色으로 종자의 新舊穀을 감정할 수 있다.

라. 옥수수(禾本科)는 활력이 강하면 농적색으로 되고 약한 종자에서는 담분홍색으로 染色된다.

마. TZ 檢定方法은 現在 國際種子檢定協會(ISTA)에서도 公認된 方法이며,^{9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20} 本 試驗에서도 判定方法을 細分하여 1~6번까지는 正常苗種子로, 7~11번(옥수수 12번)은 非正常苗로, 옥수수 14번부터, 콩과 무우씨는 12번부터는 발아가 전혀 않되는 것으로 判定한다면

種子發芽速測方法으로 사용될 수 있음이 밝혀졌다.

IV. 摘要

種子の 發芽力檢定을 2, 3, 5 Triphenyl Tetrazolium Chloride (C₁₉H₁₅ClN₄) 染色方法으로 檢定함에 있어 非正常苗를 除去하기 위하여 15~16個 形態로 細分하여 判定한 결과 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 禾本科 種子(옥수수)의 正常苗發芽種子

- 胚 全部가 赤色으로 染色
- 胚盤 兩尖端 未染色
- 胚盤 兩尖端·根鞘·幼根尖端 未染色

2. 荳科種子(콩)의 正常苗 發芽種子

- 種子 全部가 赤色으로 染色
- 子葉의 적은面積 未染色
- 幼根尖端 子葉 極小部分 未染色

3. 十字花科 種子(무우씨)의 正常苗 發芽種子

- 種子 全部가 赤色으로 染色
- 子葉의 적은 面積 未染色
- 外子葉 大部分 未染色, 內子葉 全部染色
- 幼根尖端·外子葉 大部分 未染色

V. 引用文献

1. Waller A.D. 1901: An attempt to estimate the viability of the seed by an electrical method. Proc. Roy. Soc. 68: 79-92.
2. Neljubow, N. 1925. Vital farbung von samen, schriften fur samenkunde
3. Hasegawa, K. 1933. 日林誌 15.
4. _____ 1936. Jap. Jour. Bot. 8
5. Kuhn, R. and D. Jerehl. 1941. Uber Invertseifen. VIII, Mitt, Reduktion von Tetrazoliumsalzen durch Daxterien, garende Hefe and Keimende Samen Der. Deutsch. Chem.

-
- Ges. 74: 949-952.
6. Smith F.G. 1952. The mechanism of the tetrazolium reaction in corn embryos. *Plant physiol.* 27: 445-456.
 7. Porter, R.H. 1947. The use of 2-3-5 Tetrazolium chloride as a measure of seed germinability. *Plant physiology* 22, pp. 149-159.
 8. 柳澤聰雄 1953 . 日林誌 35.
 9. Don F. Grab and James C. Delouche 1959, rapid viability Tests.
 10. Robert B. Metzger. The vitascope an aid for rapid determination of viable seed with tetrazolium.
 11. James C. Delouche 1962. The tetrazolium Test for seed Viability.
 12. 宋載炎, 中華民國 53年 . 種子生活力之速測法 pp.1-41
 13. International rules for seed testing 1966.
 14. International rules for seed testing 1976.
 15. International rules for seed testing 1988.
 16. L.O. Copeland 1976. Principles of Seed Science and Technology.
 17. Don F. Grabe 1970. Tetrazolium Testing Hand Book.
 18. R.P. Moore, 1985. Handbook on tetrazolium testing.
 19. 全遇滂 1968 . 種子發芽速測法, 農檢秀報 10卷 第4號, pp.59-62
 20. _____ 1968 . 種子檢查概要, 國立農產物檢查所 pp.313-341