

不同取代度的甲壳素磷酸酯钾对番茄种子萌发的作用*

Effects of Substitution of Different Degrees of Potassium Chitin Phosphates on Seed Germination of *Lycopersicon esculentum*

盛家荣, 黄初升, 袁达波, 莫树花

Sheng Jiarong, Huang Chusheng, Yuan Dabo, Mo Shuhua

(广西师范学院, 广西南宁 530001)

(Guangxi Teachers College, Nanning, Guangxi, 530001, China)

摘要:用甲壳素合成 $1^{\#}$ ~ $7^{\#}$ 甲壳素磷酸酯和甲壳素磷酸酯钾,分别测定 $1^{\#}$ ~ $7^{\#}$ 甲壳素磷酸酯的取代度,将甲壳素磷酸酯钾配成0.5 mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L溶液,以蒸馏水为对照,进行番茄(*Lycopersicon esculentum*)种子的浸种发芽实验。浸种46.5~76.5h;培养温度29.5℃;每只培养皿50粒,每种浓度重复3次。结果表明: $6^{\#}$ 、 $7^{\#}$ 甲壳素磷酸酯钾对番茄种子不具有促进作用;而 $1^{\#}$ ~ $5^{\#}$ 甲壳素磷酸酯钾对番茄种子有不同程度的促进作用,其质量浓度以0.5 mg/L~20 mg/L为最佳,其中 $1^{\#}$ 、 $2^{\#}$ 、 $3^{\#}$ 、 $4^{\#}$ 、 $5^{\#}$ 甲壳素磷酸酯钾对番茄种子的发芽率分别比对照组增长6.7%、17.4%、16.7%、6.0%、16.0%。

关键词:种子萌发 促进作用 甲壳素磷酸酯钾 合成

中图分类号:Q945

Abstract: A series of Chitin Phosphate ($1^{\#}$ to $7^{\#}$) and Potassium Chitin Phosphate were synthesized from Chitin. The degrees of substitution of Chitin Phosphate $1^{\#}$ to $7^{\#}$ were determined. The Potassium Chitin Phosphate were prepared into solutions of 0.5 mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L and 20 mg/L. *Lycopersicon esculentum* was applied in the trial, with 50 seeds in each petri dish, soaking time from 46.5 hours to 76.5 hours from species to species, thrice repeats for each concentration, the distilled water as control. The culture temperature was 29.5 C. Potassium Chitosan Phosphate $6^{\#}$ and $7^{\#}$ had no promotive effect to the *Lycopersicon esculentum*. Potassium Chitosan Phosphate $1^{\#}$, $2^{\#}$, $3^{\#}$, $4^{\#}$ and $5^{\#}$ increased the germination rate of the seeds of the *Lycopersicon esculentum* by 6.7%, 17.4%, 16.7%, 6.0%, 16.0% respectively as compared with the control. The favorable concentration ranged from 0.5 mg/L to 20 mg/L.

Key words: seed germination, promotion, potassium chitin phosphate, synthesis

甲壳素广泛分布于许多低等动物(如虾、蟹等)的外壳及一些低等植物(如真菌、藻类等)的细胞壁中,是自然界中仅次于纤维素的第二大天然聚合物,亦是地球上除蛋白质外数量最大的含氮天然有机化合物,估计每年自然界生物合成的甲壳素达 $100 \times 10^8 \text{t}^{[1]}$ 。由于甲壳素分子结构中含有N-乙酰氨基、羟基、 β -1,4-糖苷键,可以通过甲壳素酶或化学方法进

行结构改造和修饰产生一系列应用价值高的多功能的甲壳素衍生物;这些衍生物因其分子量、修饰基团、脱乙酰基程度不同,它们的溶解性、粘度、成膜性等各有特色,因而广泛用于食品工业、医药工业、轻纺工业、环保、化学分析、功能材料、农业等诸多领域中;特别是在农业方面,被认为是一种新型的植物生长调节剂、土壤改良剂、植物病害诱抗剂、种衣剂、抗旱剂或保水剂、果蔬保鲜剂、饲料添加剂、农药载体、可降解地膜等,而且其用量很少、无毒并可被微生物降解,对环境无污染,因此,可望在农业生产中发挥重要作用,已逐渐成为人们研究的热点^[1~5]。

2003-04-21 收稿,2003-09-11 修回。

* 广西青年科学基金资助项目(桂科青 0229024);广西教育厅科研基金资助项目。

种子萌发是植物生活周期中非常重要的一个阶段,其间涉及籽实内部淀粉、蛋白质、脂肪等大分子物质的分解及能量的释放^[6]。如何打破种子休眠,促进种子萌发,进而加速植株生长发育,是种子研究中的一个重点。基于此,我们直接用甲壳素合成甲壳素磷酸酯钾并进行番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 浸种发芽的活性实验,以期得到一种价廉、低浓、高效的新型植物生长调节剂。

1 实验部分

1.1 主要材料和仪器

氢氧化钠、碳酸钾、五氧化二磷、盐酸、氯化钠、甲基橙等试剂均为国产分析纯;甲烷磺酸为化学纯;粗制甲壳素购自广西北海。

红宝石 2 号番茄是佛山农苑园艺种子种苗行出品。

pH 值滴定计为 ZD-2 型。

1.2 合成实验

1.2.1 精制甲壳素 粗制甲壳素→10%的盐酸浸泡 1 h→水洗→干燥→成品。

1.2.2 制备甲壳素磷酸酯 准确称取 2g 甲壳素加入一定量的甲烷磺酸溶解后,再加入 P_2O_5 ,在 0~5℃ 搅拌 2~3 h,反应完后,加入有机溶剂使产物沉淀,抽滤洗涤。

1.2.3 制备甲壳素磷酸酯钾 往甲壳素磷酸酯中滴入 0.5 mol/L K_2CO_3 中和,过滤后干燥得到甲壳素磷酸酯钾。

1.2.4 取代度测定^[7,8] 准确称取 0.5 g 甲壳素磷酸酯,溶于 150 ml 蒸馏水中,加入 5 ml 0.3161 mol/L 的盐酸标准溶液,用 0.3019 mol/L 的氢氧化钠标准溶液滴定,每次滴入 0.3 ml,搅拌,待 pH 值稳定后读数,以氢氧化钠溶液的滴定体积为横坐标,pH

表 1 甲壳素磷酸酯钾合成的方案与结果

实验序号	甲壳素质量 (g)	五氧化二磷质量 (g)	甲烷磺酸 (ml)	反应时间 (h)	取代度	甲壳素磷酸酯钾 (g)
1	2.006	1.829	14.0	2	0.417	0.330
2	2.004	3.741	16.0	2.5	0.481	0.420
3	2.002	5.295	12.0	3	0.247	0.380
4	2.004	7.066	16.0	2	0.474	0.600
5	2.009	1.842	12.0	2.5	0.282	0.450
6	2.001	3.785	14.0	3	0.482	0.290
7	1.999	0.861	12.0	2.5	0.582	0.370

值为纵坐标作图,计算取代度:总取代度 $DS = 0.203A/(1 - 0.081A)$,其中

$$A = C_{NaOH}(V_2 - V_1)/W,$$

式中 V_1 为坐标图中第 1 次开始突跃处的 NaOH 体积 (ml); V_2 为坐标图中第 2 次开始突跃处的 NaOH 体积 (ml); W 为甲壳素磷酸酯的质量。

采用均匀设计法考察合成过程中反应时间、五氧化二磷质量、甲烷磺酸用量对甲壳素磷酸酯取代度的影响。

1.3 生物活性实验^[9]

准确称取 10 mg 的甲壳素磷酸酯钾配成 100 mg/L 的母液,并用母液配成 0.5 mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L 的甲壳素磷酸酯钾梯度溶液,分别以蒸馏水为对照,对番茄进行浸种发芽实验,采用自然变温法测定(平均室温 $t = 29.5^\circ C$,为每天同一时间测出室内温度的平均值)。在直径为 11.5 cm 的培养皿中垫上一张滤纸做发芽床,在其内均匀地放置经挑选过的纯净种子,每只培养皿 50 粒,每 1 种受体种子依质量浓度不同各做 1 组测定,另加对照(蒸馏水)1 组,每组 3 次重复。从置床之日起每天定时起盖通气 2 次,加入相应的甲壳素磷酸酯钾溶液和蒸馏水,以保证发芽床湿润,每隔一定时间进行观测和记录。萌发的指标以吐白为准,萌发的时间从首次加入溶液时起算。

2 结果

2.1 甲壳素磷酸酯钾的合成方案与结果

甲壳素磷酸酯钾的合成方案与结果见表 1。表 1 数据表明,甲壳素磷酸酯钾的合成过程中的反应时间、五氧化二磷质量及甲烷磺酸用量对甲壳素磷酸酯取代度均有影响。

2.2 甲壳素磷酸酯钾对种子发芽的生物活性实验结果

2.2.1 1[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子发芽的影响

表 2 1[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子发芽率的影响

发芽时间 (h)	发芽率(%)					
	0 mg/L	0.5 mg/L	2 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
40	46.7	43.3	41.3	44.7	42.0	49.3
45.5	62.7	59.3	59.3	57.3	64.7	60.0
52	74.7	77.3	78.7	72.0	78.7	76.0
63.5	86.0	93.3	92.7	84.7	88.7	91.3
65.5	87.3	93.3	94.0	87.3	88.7	91.3

由表 2 可知,1[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子发芽具有一定的促进作用,其中以 2 mg/L 最好。65.5 h 时质量浓度为 2 mg/L 组的发芽率比对照组增长 6.7%。

2.2.2 2[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子发芽率的影响

表 3 2[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子发芽率的影响

发芽时间 (h)	发芽率(%)					
	0 mg/L	0.5 mg/L	2 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
40	13.3	15.3	21.3	19.3	14.0	14.0
48	24.7	43.3	40.0	34.7	30.0	40.7
53	36.7	58.0	54.7	45.3	45.3	52.7
64	66.0	82.7	71.3	70.7	74.0	73.3
72	72.0	88.7	79.3	79.3	86.0	81.3
76.5	75.3	92.7	82.7	88.0	88.7	86.0

由表 3 可知,2[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子发芽具有明显促进作用,其中以 0.5 mg/L 最好。76.5 h 时质量浓度为 0.5 mg/L 组的发芽率比对照组增长 17.4%。

2.2.3 3[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子发芽率的影响

表 4 3[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子发芽率的影响

发芽时间 (h)	发芽率(%)					
	0 mg/L	0.5 mg/L	2 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
41	8.0	20.0	31.3	26.7	28.7	32.0
47	18.0	30.7	44.7	47.3	40.0	44.0
64	58.0	72.7	84.0	81.3	79.3	78.7
68	64.7	81.3	87.3	86.7	86.0	84.7
71	66.0	81.3	88.0	86.7	86.7	85.3
73	72.0	83.3	88.7	88.7	88.0	87.3

由表 4 可知,3[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子发芽具有明显促进作用,其中以 2 mg/L 最好。73 h 时

质量浓度为 2 mg/L 组的发芽率比对照组增长 16.7%。

2.2.4 4[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子发芽率的影响

表 5 4[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子发芽率的影响

发芽时间 (h)	发芽率(%)					
	0 mg/L	0.5 mg/L	2 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
43	38.7	46.0	44.7	44.0	56.0	46.7
45	45.3	52.7	51.3	49.3	60.7	53.3
50	54.7	66.0	59.3	64.0	69.3	60.7
54	67.7	71.3	64.0	70.0	77.3	70.0
58	76.0	78.7	72.0	74.0	82.0	79.3

由表 5 可知,4[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子的发芽具有促进作用,其中以 10 mg/L 最好。58 h 时质量浓度为 10 mg/L 组的发芽率比对照组增长 6.0%。

2.2.5 5[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子发芽率的影响

由表 6 可知,5[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子的发芽具有促进作用,其中以 20 mg/L 最好。52 h 时质量浓度为 20 mg/L 组的发芽率比对照组增长 16.0%。

2.2.6 6[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子发芽率的影响

表 6 5[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子发芽率的影响

发芽时间 (h)	发芽率(%)					
	0 mg/L	0.5 mg/L	2 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
34.5	15.3	14.0	24.7	14.0	16.0	24.0
45	55.3	52.0	70.0	59.3	60.0	70.0
46.5	60.7	58.7	71.3	60.0	64.0	76.7
48	62.7	63.3	72.7	64.0	66.0	79.3
49.5	64.0	66.0	75.3	65.3	68.7	82.0
52	69.3	70.0	80.0	69.7	71.3	85.3

表 7 6[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子发芽率的影响

发芽时间 (h)	发芽率(%)					
	0 mg/L	0.5 mg/L	2 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
29.5	15.3	11.3	8.0	4.7	12.0	9.3
31	24.7	17.3	15.3	7.3	16.7	14.0
32.5	30.0	27.3	20.7	11.3	21.3	16.7
35	42.0	34.0	34.0	20.0	36.0	28.0
42.5	72.0	70.0	71.3	56.0	70.7	58.7
46.5	78.0	78.7	78.0	68.7	78.0	72.7

由表 7 可知,6[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子发芽不具有促进作用。

2.2.7 7[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子发芽率的影响

表 8 7[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子发芽率的影响

发芽时间 (h)	发芽率(%)					
	0 mg/L	0.5 mg/L	2 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
39	50.0	50.0	43.3	53.3	50.7	40.0
46.5	67.3	73.3	69.3	75.3	72.7	60.7
50.5	74.0	79.3	77.3	78.7	82.7	74.7
52	79.3	82.0	78.0	82.7	84.0	78.0
54	81.3	84.7	82.0	84.0	84.0	84.0
65	93.3	94.7	90.7	92.7	95.3	92.7

由表 8 可知,7[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子发芽不具有明显的促进作用。

3 结束语

(1)本次实验结果表明,不同取代度的甲壳素磷酸酯钾对番茄种子的发芽有不同程度的作用。其中 6[#]、7[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子的发芽均不具有促进作用。而 1[#]~5[#]甲壳素磷酸酯钾对番茄种子的发芽有不同程度的促进作用,其最佳质量浓度以 0.5~20 mg/L 效果最好。其中 1[#]、2[#]、3[#]、4[#]、5[#]甲壳素磷酸酯钾在质量浓度分别为 2 mg/L、0.5 mg/L、2 mg/L、10 mg/L、20 mg/L,萌发时间分别为 65.5 h、76.5 h、73 h、58 h、52 h 时番茄种子的发芽率分别比对照组增长 6.7%、17.4%、16.7%、6.0%、16.0%。

(2)对番茄进行浸种发芽实验,由于采用自然变温法测定(平均室温为每天同一时间测出室内温度的平均值),实验时间为 2003-04-26~2003-05-30,尽管平均室温 $t = 29.5^{\circ}\text{C}$,然每天的具体温度不同、不同时间段里的温差也较大,因此在不同时间浸种的效果就不一样,如表 2、表 3 中的对照组在浸种 40 h 时发芽率分别为 46.7%、13.3%。

(3)文献[10]报道番茄种子用 0.005%~

0.05%石油助长剂处理能促进种子发芽,提高种子的发芽率,而本次实验使用甲壳素磷酸酯钾的质量浓度为 0.5~20 mg/L,即 0.00005%~0.002%就可促进番茄种子发芽,提高种子的发芽率。可见使用甲壳素磷酸酯钾浸种的质量浓度较低。又因甲壳素磷酸酯钾合成过程简单,成本低,因此,在农业上有巨大的应用前景。

参考文献:

- 1 蒋挺大. 甲壳素. 北京:中国环境科学出版社,1996.1~2, 429~455.
- 2 段新芳. 甲壳素和壳聚糖的研究及其在农林业中的应用. 世界林业研究,1998,(3):9~13.
- 3 Simon C W R, Hanno V J K, Ruth D. Potential of low molecular chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. International Journal of Pharmaceutics, 1999,178:231~243.
- 4 Bol J F, Linthorst H J M, Cornelissen B J C. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. Annu Rev Phytopathol, 1990,28:113~138.
- 5 Donald Freepos. Enhancing food production with chitosan-seed-coating technology. In: Donald Freepos. eds. Application of Chitin and Chitosan. Lancaster: Technomic Company Publishing, Inc, 1997. 129~139.
- 6 余朝霞, 黄雪群, 方志尚, 等. GA 对林木种子萌发的调控研究进展. 浙江林业科技, 2003,23(1):73.
- 7 马全红, 高永红, 皱宗柏. 丙酮酸壳聚糖衍生物的制备及其吸附性能研究. 东南大学学报(自然科学版), 2000,30(6):127~129.
- 8 陈凌云, 杜予民, 肖玲, 等. 羧甲基壳聚糖的取代度及保湿性. 应用化学, 2001,18(1):5~8.
- 9 吴人坚, 张丕方, 郑师章, 等. 植物学实验方法. 上海: 上海科学技术出版社, 1987. 52.
- 10 周兴灏. 植物生长调节剂在蔬菜上的应用. 北京: 化学工业出版社, 2002. 54.

(责任编辑: 邓大玉)