

超声波与渗透调节处理对油松种子萌发的影响

史锋厚¹, 朱灿灿², 沈永宝¹, 施季森¹

(1. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037; 2. 江苏省-中国科学院植物研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 通过正交试验设计(L_93^4), 研究了超声波和渗透调节处理对油松 *Pinus tabulaeformis* 种子萌发和萌发前期物质代谢的影响。结果表明: 聚乙二醇(PEG)渗透调节和超声波处理会对油松种子萌发和萌发前期物质代谢产生一定的影响, 但具体影响效果不同。PEG 促进种子萌发的作用随着溶液质量分数的增大而增强, 其中质量分数为 20%PEG 溶液对油松种子萌发具有显著促进作用, 并显著促进种子萌发前期可溶性糖和可溶性蛋白质质量分数的增加。59 kHz 超声波处理油松种子 10 min, 可显著提高种子发芽率和发芽指数, 同时加速种子萌发前期淀粉的分解, 并提高可溶性蛋白的质量分数。超声波和 PEG 渗透调节处理油松种子最佳组合为质量分数为 20%PEG 溶液浸种 24 h, 然后经 59 kHz 超声波处理 10 min。表 3 参 17

关键词: 森林培育学; 超声波; 渗透调节; 油松; 种子萌发

中图分类号: S723.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2011)04-0545-05

Effects of ultrasonic wave and osmotic treatments on germination of *Pinus tabulaeformis* seed

SHI Feng-hou¹, ZHU Can-can², SHEN Yong-bao¹, SHI Ji-sen¹

(1. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China

2. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China)

Abstract: The effects of ultrasonic wave and polyethylene glycol(PEG) osmotic treatments on germination and the metabolic mechanism during initial germinating stages of *Pinus tabulaeformis* seeds were studied through an orthogonal design(L_93^4). The results showed that: PEG osmotic adjustment and ultrasonic treatments have different effects on the seed germination and the metabolic mechanism during initial germinating stages of *Pinus tabulaeformis* seeds. The effect of PEG promotes seed germination, which increases with the increment of PEG soluble concentration, and 20% PEG solution significantly promotes seed germination and significantly increases the content of soluble sugar and soluble protein during the initial germinating stages. The germination rate and germination index could be significantly increased, the decomposition of starch could be accelerated, and the content of soluble protein could be increased during initial germinating stages after the seeds treated with 59 kHz ultrasonic wave on 10 min. The best treatment combination of ultrasonic and PEG osmotic adjustment treatment was: the seeds soaked in 20% PEG solution for 24 h, and then treated with 59 kHz ultrasonic wave for 10 min. [Ch, 3 tab. 17 ref.]

Key words: silviculture; ultrasonic wave; osmotic adjustment; *Pinus tabulaeformis*; seed germination

种子调制的方法有多种, 其中超声波处理和聚乙二醇(PEG)渗透调节同属于物理调制方法。超声波是一种机械振动波, 具有波长短, 能量高, 穿透力强, 定向传播等优点, 其机械效应、热效应和空化效应具有广泛的生物学效应, 现已被应用到包括种子处理等多种生物领域研究中^[1-2]。PEG 是一种高分子渗

收稿日期: 2010-09-06; 修回日期: 2010-11-15

基金项目: 教育部资助项目(505002)

作者简介: 史锋厚, 实验师, 博士, 从事林木种苗学研究。E-mail: fhshi406@yahoo.com.cn。通信作者: 沈永宝, 教授, 博士生导师, 从事森林培育学和园林植物与观赏园艺等研究。E-mail: ybshen@njfu.edu.cn

透调节剂,应用于种子处理,可以提高种子生活力、引发种子、提高种子发芽率和缩短发芽时间等^[3-5]。以2种物理方法分别处理种子的研究较多,但将2种方法结合运用于种子处理的文献报道较少。本研究以中国常见的绿化先锋树种油松 *Pinus tabulaeformis* 种子为研究材料,通过正交试验设计对种子进行预处理,探索超声波处理和渗透调节组合对种子处理效果,对其应用于种子调制的可行性进行验证。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

油松种子由河北省林木种苗站提供,为2007年秋季正常成熟的种子。按照国家标准 GB 7908 - 1999《林木种子质量分级》,种子质量分级均为 I 级(发芽率 > 90%,含水量为 8%)。种子采收后风干室温储藏于南京林业大学种子中心室内。种子自然老化 1 a 后,于 2008 年 12 月在种子中心生理实验室进行处理并开展发芽及生理指标测定;超声波处理用 SK 8200HP 超声波清洗仪(59 kHz, 500 W),处理介质为自来水;PEG 6000 由中国医药(集团)上海化学试剂公司生产,PEG 溶液为质量百分比水溶液。

1.2 试验设计

试验采用 L_93^4 正交试验设计,试验因子设计见表 1。

依据正交试验设计组合,油松种子经 PEG 溶液浸种后再进行超声波处理,清水冲洗数次,进行电导率测定和发芽测定实验。依照 GB 2772 - 1999《林木种子检验规程》进行苗床发芽试验, 5×100 粒。发芽温度为 25 ℃,光照 12 h,适量水分,发芽测定时间为 21 d。 4×100 粒种子进行发芽测定,统计种子萌发情况;另 100 粒种子用于生理指标测定取样,具体取样方法为置床 72 h 后随机选取种子置于 -76 ℃超低温冰箱备用,各个生理指标测定重复 3 次。

1.3 测定指标、测定方法和数据处理

①发芽率 $P_c = G/S$, G 指在测定时间内正常发芽种子数, S 指发芽测定种子数。②发芽指数: $I_c = \sum G_t / D_t$, G_t 指在不同时间(第 t 天)的发芽量, D_t 指不同的发芽试验天数。③活力指数:活力指数 = 发芽指数 \times 苗鲜质量,苗鲜质量指发芽结束后,每份发芽苗中随机选取 10 株完整幼苗,天平称量,以平均值表示苗鲜质量。④相对电导率:测定方法参考种子生理实验手册。⑤可溶性糖质量分数:采用蒽酮比色法测定。⑥淀粉质量分数:采用蒽酮比色法测定。⑦可溶性蛋白质量分数:采用考马斯亮蓝法测定。

测定和统计数据由 SAS 6.12 和 Excel 2003 软件进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 超声波处理和渗透调节处理组合对种子萌发的影响

超声波处理和渗透调节处理分别具有提高种子发芽率、加速种子萌发的作用。油松种子发芽测定指标方差分析和多重对比结果可见表 2 和表 3。方差分析结果(表 2)表明:正交试验设计各组合之间对种子发芽率、发芽指数和活力指数的影响均达极显著水平;超声波处理时间对种子萌发的影响均达极显著水平;PEG 质量分数对种子发芽率和发芽指数的影响达极显著水平,对活力指数的影响达显著水平 ($P = 0.0134$);PEG 质量分数和处理时间对种子处理效果具有明显的交互作用,此交互作用对种子发芽率、发芽指数和活力指数的影响均达极显著水平;PEG 处理时间对种子萌发无显著影响。

由多重比较(表 3)可知:利用 PEG 渗透处理油松种子可以显著提高种子发芽率、发芽指数和活力指数,这种促进效果随着 PEG 质量分数的增大而增强,以 10%PEG 溶液处理种子时便可显著提高种子发芽率和发芽指数,经 20.0%PEG 溶液处理后的种子发芽率、发芽指数和活力指数相比不含 PEG 处理(0)种子分别提高 54.1%, 47.8%和 36.4%;59 kHz 超声波处理对种子萌发的作用效果不同,处理时间为 10 min 时可以提高种子发芽率,并促进种子快速萌发,发芽率和发芽指数比超声波 0 min 处理种子分别提

表 1 油松种子正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment for *Pinus tabulaeformis* seed

水平	PEG 质量 分数/%	PEG 处理 时间/h	PEG 质量分数 \times 处理时间	超声波处理 时间/min
1	0	12	1	0
2	10	24	2	10
3	20	36	3	20

高 18.0%和 18.2%，活力指数略微下降但差异并不显著；超声波处理 20 min，种子发芽率、发芽指数和活力指数均显著下降，比对照分别下降 30.0%，33.3%和 41.7%。通过方差分析和多重比较，根据种子发芽测定结果可得最佳处理组合：油松种子经 20%PEG 溶液浸种 12 h，然后 59 kHz 超声波处理 10 min。

表 2 方差分析结果统计

Table 2 Results of variance analysis

指标	组合	PEG 质量分数	PEG 时间	PEG 质量分数×时间	超声波时间	
发芽率	F 值	11.20**	14.56**	3.17	6.56**	20.51**
	P 值	0.000 1	0.000 3	0.069 4	0.008 3	0.000 1
发芽指数	F 值	9.89**	10.00**	1.67	7.71**	20.17**
	P 值	0.000 1	0.001 5	0.218 7	0.004 5	0.000 1
活力指数	F 值	9.05**	5.71*	2.28	11.61**	16.58**
	P 值	0.000 1	0.013 4	0.134 1	0.000 8	0.000 1
相对电导率	F 值	1.10	0.96	0.45	0.69	2.32
	P 值	0.404 9	0.403 0	0.643 7	0.512 5	0.127 3
可溶性糖	F 值	2.96*	8.36**	0.41	2.24	0.84
	P 值	0.026 5	0.002 7	0.666 8	0.135 7	0.447 1
淀粉	F 值	2.69*	2.51	2.88	0.66	4.72*
	P 值	0.038 6	0.109 2	0.082 3	0.531 2	0.022 4
可溶性蛋白	F 值	4.78**	10.26**	1.83	3.57*	3.46
	P 值	0.002 8	0.001 1	0.188 5	0.049 5	0.053 6

表 3 多重对比结果统计

Table 3 Results of Duncan test

因素	水平	发芽率/%	发芽指数	活力指数	可溶性/(g·kg ⁻¹)	淀粉/(g·kg ⁻¹)	可溶性蛋白/(mg·g ⁻¹)
PEG 质量分数/%	0	37 C	2.308	0.347 80 B	20.3 B		48.985 B
	10	47 B	2.905	0.421 30 AB	19.8 B		50.377 B
	20	57 A	3.413	0.474 52 A	24.5 A		64.525 A
超声波时间/min	0	50 B	3.111	0.522 00 A		96.6 AB	51.298 B
	10	59 A	3.677	0.447 64 A		93.0 B	60.368 A
	20	35 C	2.075	0.304 53 B		99.9 A	52.221 B

说明：显著性 $\alpha = 0.05$ ，相同字母表示差异不显著；空白项表示方差分析不显著，无多重对比。

2.2 超声波处理和渗透调节处理组合对种子膜透性的影响

种子在浸泡过程中，可溶性物质或电解质通过细胞膜外渗，渗漏越多，细胞膜的完整性越低，浸泡液的电导率就越高，因此，可以利用浸泡液的电导率值反映种子细胞质渗漏情况，定量描述种子活力^[8]。对经过 PEG 渗透处理和超声波处理后的种子测定相对电导率，各处理组合方差分析见表 2。各处理组合对油松种子相对电导率影响不显著，PEG 质量分数和处理时间、超声波处理对种子相对电导率无显著影响，PEG 质量分数和时间对相对电导率的影响不存在交互作用。超声波处理和渗透调节处理对种子膜透性影响不显著原因可能与 PEG 渗透调节处理使得质膜修复能力提高，即使使用相当剂量的超声辐射也不能使种子质膜透性增大，PEG 渗透调节能力与超声波的空化作用可以保护种子质膜的稳定性。

2.3 超声波处理和渗透调节处理组合对种子萌发前期物质代谢的影响

种子萌发启动后，其内部物质代谢加强，原有储藏性物质逐渐分解为可溶性物质并被种苗生长所利用，可溶性糖和可溶性蛋白是组织器官生长发育的能量来源和建构性物质，淀粉是种子中重要的储藏物质，3 种物质的变化可以反映种子萌发初始阶段物质代谢的强弱。

通过对置床 72 h 后(油松种子萌发露白时间约为 1 周, 置床 72 h 正值种子萌发前期)油松种子可溶性糖、可溶性蛋白和淀粉质量分数的测定, 探索超声波处理和 PEG 渗透调节作用对种子物质代谢的影响。方差分析(表 2)可知: 不同正交试验设计各组合之间, 种子萌发前期可溶性糖、淀粉和可溶性蛋白质量分数具有显著差异, 其中可溶性蛋白质量分数的差异达极显著水平; 经不同质量分数 PEG 溶液处理后种子可溶性糖和可溶性蛋白质量分数存在极显著差异; 不同时间的超声波处理后与种子萌发前期淀粉质量分数具有显著差异; PEG 质量分数浓度和处理时间对种子萌发前期可溶性蛋白的变化影响具有交互作用; PEG 处理时间对种子内可溶性糖、淀粉和可溶性蛋白质量分数影响均不显著; 不同时间的超声波处理对可溶性糖和可溶性蛋白质量分数影响不显著。由多重对比(表 3)可知: PEG 质量分数对种子萌发前期可溶性糖和可溶性蛋白质量分数的影响达显著水平, 影响渗透调节的效果, 当使用 20%PEG 溶液处理种子时, 种子可溶性糖和可溶性蛋白质量分数均高于未处理种子, 增幅分别为 20.7%和 31.7%; 与 10%PEG 溶液处理种子相比也具有显著差异, 分别高 23.7%和 28.1%。不同时间超声波处理对萌发前期的油松种子淀粉和可溶性蛋白质量分数的影响效果不同, 超声波处理 10 min 后, 种子淀粉下降最快, 相对对照下降 3.7%; 可溶性蛋白相对对照增加最快, 增加值为 $9.07 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 增幅达 17.7%。超声波处理时间为 20 min 时, 种子可溶性蛋白增加较少, 仅比对照增加 1.8%, 淀粉分解速度慢于未经处理种子。通过综合分析, 以种子萌发前期可溶性糖、可溶性蛋白以及淀粉质量分数为衡量标准, 超声波和渗透调节最佳处理组合为: 油松种子经 20%PEG 溶液处理后再经 59 kHz 超声波处理 10 min。

3 结论与讨论

3.1 PEG 渗透调节促进种子萌发

PEG 作为一种惰性高分子渗透保护剂, 其溶液具有降低水势的作用。PEG 处理促进种子萌发的原因在于 PEG 溶液通过渗透调控种子细胞吸水速度, 修复细胞膜, 恢复种子活力^[3-4], 但不同学者对 PEG 处理是否对种子萌发代谢存在启动和促进作用存在争论^[9]。本试验中, 经过 PEG 溶液处理的油松种子发芽率、发芽指数和活力指数均有提高, 说明 PEG 处理确实可以促进种子萌发。这与张伟峰等^[3]、孙建华等^[4]、丁永乐等^[5]和 Mc Donaldm^[10]报道结论相符合。在本试验中, PEG 促进种子萌发的作用随着溶液质量分数的增大而增强, 20%PEG 溶液表现出了较好的效果, 均显著提高了种子发芽率、发芽指数和活力指数, 同时也显著促进了种子内可溶性糖和可溶性蛋白的代谢。这与洪法水等^[11]、陈源等^[12]、刘杰等^[13]报道相符合。在本试验中仅设置 2 种质量分数处理和 3 种时间处理梯度, 所表现出的规律性还相对有限, 在今后的研究中应增加设置梯度, 从而使得实验结果更加可靠; 同时种子 PEG 渗透条件的选择应以种子为出发点, 围绕种子吸水过程, 结合 PEG 溶液所能营造的渗透氛围, 进行合理的选择^[9]。

3.2 超声波处理促进种子萌发

超声波的生物学效应主要表现在空化、热效应和机械效应以及消毒效应^[1-2,14], 可以加速种子萌发, 提高种子发芽率和发芽速度, 这已在本试验中被验证。这与庄南生等^[15]、李刚等^[16]、孙群等^[17]报道相符合。59 kHz 超声波处理 10 min, 对油松种子萌发的促进作用最为明显, 发芽率和发芽指数分别增加 18%, 同时经该时间处理的油松种子在萌发前期, 淀粉分解相对加快, 可溶性蛋白显著提高。但处理时间为 20 min 时, 超声波处理不仅未表现出对种子萌发的促进作用, 反而抑制种子萌发, 原因可能在于超声波时间超过适宜范围, 超声波对包括细胞膜在内的细胞组织器官产生了破坏作用, 导致种子活力下降。

3.3 油松种子处理最佳优化体系

通过 L_93^4 正交试验设计, 探索超声波处理和 PEG 渗透调节对种子萌发的影响, 依据发芽测定结果和营养物质代谢测定指标, 选择油松种子利用 59 kHz 超声波和 PEG 渗透调节处理的组合为: 20% PEG 溶液浸种 24 h, 然后经 59 kHz 超声波处理 10 min。该组合在正交试验设计表中未出现, 需要具体实验验证。同时根据本试验结果, 可将超声波处理和渗透调节处理综合运用于油松种子生产调制。

参考文献:

- [1] 蒋玲艳, 王林果. 生物技术领域中超声波的应用[J]. 生物技术通讯, 2006, 17 (1): 126 - 128.
JIANG Lingyan, WANG Linguo. Application of ultrasound in biotechnology [J]. *Lett Biotechnol*, 2006, 17 (1): 126

- 128.

- [2] 时兰春, 王伯初, 杨艳红, 等. 低强度超声波在生物技术中应用的研究进展[J]. 重庆大学学报, 2002, **25** (10): 139 - 132.
SHI Lanchun, WANG Bochu, YANG Yanhong, *et al.* Application of low intensity ultrasound to biotechnology [J]. *J Chongqing Univ*, 2002, **25** (10): 139 - 132.
- [3] 张伟峰, 孙渭, 李斌, 等. 几种化学药剂对烟草种子萌发的促进效果[J]. 种子, 2004, **23** (12): 20 - 23.
ZHANG Weifeng, SUN Wei, LI Bin, *et al.* Effect of soaking with some chemicals on the promotion of tobacco seed germination[J]. *Seed*, 2004, **23** (12): 20 - 23.
- [4] 孙建华, 王彦荣, 余玲, 等. 聚乙二醇引发对几种牧草种子发芽率和活力的影响[J]. 草业学报, 1999, **8** (2): 34 - 42.
SUN Jianhua, WANG Yanrong, YU Ling, *et al.* Effects of osmotic priming with polyethylene glycol on seed germination and vigour of some herbage species[J]. *Acta Prat Sci*, 1999, **8** (2): 34 - 42.
- [5] 丁永乐, 杨铁钊, 郑宪滨, 等. PEG 对烤烟种子萌发和幼苗生理特性的影响[J]. 河南农业科学, 2000 (1): 8 - 10.
DING Longle, YANG Tiezhao, ZHENG Xianbin, *et al.* Effect of PEG on seed germination and physiological characteristics of tobacco[J]. *J Henan Agric Sci*, 2000 (1): 8 - 10.
- [6] 黄学林, 陈润政. 种子生理实验手册[M]. 北京: 北京大学出版社, 1990.
- [7] 上海植物生理学会. 植物生理学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.
- [8] 王振宝, 王树春, 徐国良. 一种种子活力的测定方法——电导率法[J]. 种子, 1998, **17** (3): 70.
WANG Zhenbao, WANG Shuchun, XU Guoliang. A method for determining seed vigor-conductivity method [J]. *Seed*, 1998, **17** (3): 70.
- [9] 朱灿灿, 史锋厚, 沈永宝, 等. PEG 处理对油松种子萌发的影响[J]. 种子, 2007, **26** (8): 63 - 67.
ZHU Cancan, SHI Fenghou, SHEN Yongbao, *et al.* Effects of PEG treatment on germination of Chinese pine seed [J]. *Seed*, 2007, **26** (8): 63 - 67.
- [10] Mc DONALD B. Seed deterioration physiology, repair and assessment [J]. *Seed Sci Technol*, 1999, **27**: 177 - 237.
- [11] 洪法水, 马成仓, 王旭明, 等. 聚乙烯醇预处理小麦种子对萌发代谢及生长的影响[J]. 作物学报, 1997, **23**(2): 247 - 252.
HONG Fashui, MA Chengcang, WANG Xuming, *et al.* Effect of polyvinyl alcohol pretreatment on seed germination metabolism and growth of wheat[J]. *Acta Agron Sin*, 1997, **23** (2): 247 - 252.
- [12] 陈源, 冯建民, 汪爱君, 等. 马尾松种子活化技术研究[J]. 浙江林业科技, 1999, **19** (2): 21 - 25.
CHEN Yuan, FENG Jianmin, WANG Aijun, *et al.* Studies on activation techniques for seed of *Pinus massoniana* [J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 1999, **19** (2): 21 - 25.
- [13] 刘杰, 刘公社, 齐冬梅, 等. 聚乙二醇处理对羊草种子萌发及活性氧代谢的影响[J]. 草业学报, 2002, **11** (1): 1 - 3.
LIU Jie, LIU Gongshe, QI Dongmei, *et al.* Effect of PEG on germination and active oxygen metabolism in wildrye (*Leymus chinensis*) seeds [J]. *Acta Prat Sci*, 2002, **11** (1): 1 - 3.
- [14] 丁志山, 沃兴德. 超声波的生物学效用及其在转基因中的应用[J]. 生命科学, 1997, **9** (4): 187 - 189.
DING Zhishan, WO Xingde. Biological effects of ultrasonic and its application in transgenic biotechnology [J]. *Chin Bull Life Sci*, 1997, **9** (4): 187 - 189.
- [15] 庄南生, 王英, 唐燕琼, 等. 超声波处理柱花草种子的生物学效应研究[J]. 草业科学, 2006, **28**(3): 80 - 82.
ZHUANG Nansheng, WANG Ying, TANG Yanqiong, *et al.* The biological effect of ultrasonic wave on *Stylosanthes guianensis* seeds [J]. *Prat Sci*, 2006, **28** (3): 80 - 82.
- [16] 李刚, 王乃亮, 罗娘娇, 等. 超声波处理对当归种子萌发及活力的影响[J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2007, **43**(3): 75 - 78.
LI Gang, WANG Nailiang, LUO Niangjiao, *et al.* The effect of ultrasonic wave on *Angelica sineasia* (Oliv.)Diels seeds vitality and germination [J]. *J Northwest Norm Univ Nat Sci*, 2007, **43** (3): 75 - 78.
- [17] 孙群, 刘文婷, 梁宗锁, 等. 丹参种子的吸水特性及发芽条件研究[J]. 西北植物学报, 2003, **23** (9): 1518 - 1521.
SUN Qun, LIU Wenting, LIANG Zongsuo, *et al.* Study on the character of absorbing water and the germinative condition of *Salvia miltiorrhiza* Bunge seeds [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2003, **23** (9): 1518 - 1521.