

种子消毒方法对大葱无菌苗培养的影响

董 飞¹ 陈运起^{2*} 刘世琦¹ 高莉敏² 王传增¹

(¹山东农业大学园艺科学与工程学院, 山东泰安 271018; ²山东省农业科学院蔬菜研究所, 山东省设施蔬菜生物学重点实验室, 国家蔬菜改良中心山东分中心, 山东济南 250100)

摘 要: 采用次氯酸钠、升汞两种常用消毒剂对大葱种子进行消毒处理, 并研究添加助剂吐温 20 对大葱种子发芽和消毒效果的影响。结果表明: 用 2% 次氯酸钠消毒 40 min, 并在消毒前后添加吐温 20 对大葱种子的消毒效果最好, 能显著提高大葱种子的发芽率和发芽势, 降低污染率。

关键词: 大葱; 无菌苗; 培养; 种子; 消毒

中图分类号: S633.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-6346 (2011) 18-0074-03

Influence of Seed Disinfection Methods on Aseptic Welsh Onion Tissue Culture

DONG Fei¹, CHEN Yun-qi^{2*}, LIU Shi-qi¹, GAO Li-min², WANG Chuan-zeng¹

(¹College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China; ²Key Laboratory for Biology of Greenhouse Vegetable of Shandong Province, Vegetable Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, National Improvement Center for Vegetable, Jinan 250100, Shandong, China)

Abstract: Used sodium hypochlorite and mercuric chloride 2 common disinfectants to conduct disinfection treatment for welsh onion (*Allium fistulosum* L.) and studied the effect of Tween-20 onion seed disinfection. The results showed that 40 min soak in 2% sodium hypochlorite, and adding Tween-20 before and after disinfection was the highest in disinfection effect for welsh onion seeds, could significantly improve seed germination rate, germination energy and reduced pollution rate.

Key words: Welsh onion; Aseptic plantlet; Culture; Seed; Disinfection

大葱 (*Allium fistulosum* L.) 为百合科葱属二年生草本植物。我国栽培利用大葱的历史逾 3 000 a, 现全国各地均有栽培 (周光华, 1999)。近年来, 随着分子生物技术的迅速发展和基因工程的日趋普及, 利用转基因植株生产药物、疫苗和生物制剂愈加展示出广阔的应用前景和潜在的经济效益。在转基因植株的研究中, 无菌苗的筛选和培育是试验成功的关键, 而无菌苗一般由种子获得, 因此, 种子有效消毒显得尤为重要。迄今, 各种灭菌方法报道颇多 (Sommer et al., 1981; Dodds & Roberts, 1996; Pierik, 1997; 吴良欢和陶勤南, 1997, 1999; 杨岚 等, 2008), 但是有关大葱种子消毒的方法鲜有报道。本试验以大葱种子为材料, 设计不同的消毒方法, 观

收稿日期: 2011-06-01; 接受日期: 2011-07-14

基金项目: 国家行业 (农业) 科研专项 (200903018)

作者简介: 董飞, 女, 硕士研究生, 专业方向: 蔬菜栽培与育种, E-mail: dongfei860117@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author): 陈运起, 男, 研究员, 硕士生导师, 专业方向: 葱姜蒜育种与栽培技术, E-mail: chyq-57721@163.com

察记录大葱种子始发期、发芽率、发芽势及污染率, 为大葱种子的有效消毒提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

以山东省农业科学院蔬菜研究所提供的章丘大葱种子为试材。次氯酸钠、升汞、吐温 20 等药剂购自济南凯莱生物技术有限公司。

1.2 种子消毒处理

种子消毒处理方法: 每个处理 200 粒种子, 先将大葱种子用自来水冲洗 30 min, 然后置于超净工作台上用 75%酒精漂洗 0.5 ~ 1.0 min, 转入消毒液中进行消毒处理, 最后用无菌水冲洗 3 ~ 5 遍, 接种于 MS 培养基。

种子消毒试验设计: ① 2%次氯酸钠消毒 20 min; ② 2%次氯酸钠消毒 40 min; ③ 2%次氯酸钠消毒 60 min; ④ 0.1%升汞消毒 5 min; ⑤ 0.1%升汞消毒 10 min; ⑥ 0.1%升汞消毒 15 min。

1.3 添加吐温 20 的种子消毒处理

吐温 20 是一种去污剂, 不破坏蛋白的结构, 能够湿润整个种子, 促进消毒液进一步接触表面组织, 吸附种子内部的内生菌, 从而达到更好的消毒效果。

处理方法: 每个处理 100 粒种子, 先用自来水冲洗 30 min, 然后置于超净工作台上用 75%酒精漂洗 0.5 ~ 1.0 min, 转入 2%次氯酸钠消毒 40 min, 随后接种于 MS 培养基。

试验设计: ① 大葱种子消毒前, 用自来水冲洗时在三角瓶中加入 1 ~ 2 滴吐温 20; ② 大葱种子消毒后, 用加入吐温 20 的无菌水〔无菌水中按 10 000 V: 1 V(梁毅等, 2010)的比例添加吐温 20〕冲洗 3 ~ 5 遍, 最后用无菌水冲洗 1 遍; ③ 处理 1 与处理 2 同时进行; ④ 以正常消毒, 不添加吐温 20 为对照。

1.4 大葱无菌苗培养

将处理后的种子接种于 MS 培养基(经高压灭菌)培养, 培养基中添加 3%蔗糖、0.9%琼脂, pH 5.8 ~ 6.0。培养温度(25 ± 1) °C, 光照强度 3 000 lx, 光照时间每天 16 h。

1.5 数据分析

培养 10 d 时调查统计发芽势; 培养 30 d 时调查统计发芽率、污染率; 第 1 粒种子发芽的时间为种子发芽始期。采用 SPSS 软件进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 不同消毒方法对大葱种子发芽及消毒效果的影响

由表 1 可知, 采用 2%次氯酸钠、0.1%升汞两种试剂不同时间处理大葱种子, 处理 1 的种子始发期最短, 仅为 3 d, 与处理 4、5 差异显著, 与处理 6 差异极显著; 在发芽率和发芽势方面, 也是处理 1 最高, 分别达 88.0%和 79.0%, 且在发芽势上与其他 5 个处理存在极显著差异, 但是其污染率亦最高(12.0%), 从而影响最终的成苗率。处理 6 的污染率最低, 为 1.0%, 但发芽率和发芽势也最低, 而且种子始发期比其他处理推迟 2 ~ 4 d, 不利于种子成苗。处理 2 种子始发期、发芽率与处理 1 无显著差异, 但种子污染率较低(5%), 是对大葱种子进行

表 1 不同消毒方法对大葱种子发芽及消毒效果的影响

处理	始发期/d	发芽率/%	发芽势/%	污染率/%
1	3 cB	88.0 aA	79.0 aA	12.0 aA
2	4 bcB	87.5 aA	76.0 bB	5.0 bB
3	4 bcB	78.0 bB	73.0 cC	6.0 bB
4	5 bAB	39.5 cC	33.0 dD	2.5 cC
5	5 bAB	23.0 dD	16.0 eE	2.0 cC
6	7 aA	19.5 eE	12.5 fF	1.0 cC

注: 表中同列数据后不同小写字母表示差异显著(α=0.05), 不同大写字母表示差异极显著(α=0.01); 下表同。

消毒, 实现较高发芽率、较低污染率的理想方法。

2.2 添加吐温 20 对大葱种子发芽及消毒效果的影响

由表 2 可知, 在大葱种子消毒过程中添加吐温 20, 能显著降低种子污染率, 明显提高发芽势、发芽率, 因此可以认定添加吐温 20 对大葱种子消毒处理有积极作用。处理 3 消毒效果最佳, 种子始发期提前 2 d, 发芽势达 81%、发芽率达 90%, 而污染率仅为 2.5%。

表 2 添加吐温 20 对大葱种子发芽及消毒效果的影响

处理	始发期/d	发芽率/%	发芽势/%	污染率/%
1	5 aA	82 bB	73 cBC	2.5 bA
2	5 aA	82 bB	75 bB	2.5 bA
3	3 bA	90 aA	81 aA	2.5 bA
4 (CK)	5 aA	80 cB	72 cC	5.0 aA

3 结论与讨论

3.1 不同消毒方法的效果比较

种子消毒不仅要把表面的微生物杀死, 而且不能伤害其组织和表层细胞, 以获得不污染且存活率较高的外植体。常见的消毒剂有次氯酸钠、酒精、升汞、过氧化氢、漂白粉等。其中升汞的杀菌能力最强, 但对外植体的伤害最大, 毒性也大, 污染环境。不同植株对升汞的耐受能力不同, Rao 等 (2006) 采用 0.1% 升汞对棉花种子进行表面消毒时, 消毒时间长达 20 min 也没有对种子造成伤害, 但是解继红等 (2009) 在鹅观草属种子消毒试验中证明 0.1% 升汞消毒 3 min 效果最佳。本试验采用 0.1% 升汞对大葱种子进行消毒 (5~15 min) 时, 升汞对大葱种子的抑制作用太强, 致使大葱种子生长势、发芽势弱, 发芽持续时间长, 且消毒效果也不如 2% 次氯酸钠。

3.2 添加吐温 20 对大葱种子消毒效果的影响

吐温 20 是一种亲水性强的非离子型去污剂, 不破坏蛋白的结构, 能够湿润整个种子, 促进消毒液进一步接触表面组织, 吸附种子内部的内生菌, 从而达到更好的消毒效果 (王利民等, 2002)。本试验结果表明, 吐温 20 在大葱种子消毒中能够有效的去除种子表面的灰尘和杂质, 对大葱种子的有效消毒是十分重要的。尤其是在消毒前后均加吐温 20 (处理 3), 大葱种子的发芽率、发芽势有明显提高, 而且污染率低。因此, 用 2% 次氯酸钠消毒 40 min, 在消毒前后均添加吐温 20 为大葱种子有效的消毒方法。

参考文献

- 解继红, 于靖怡, 陈景芋, 徐柱. 2009. 鹅观草属种子消毒及无菌播种的研究. 种子, 28 (3): 25-27.
- 梁毅, 王永勤, 关绚丽, 于春霞, 张智, 田保华. 2010. 不同消毒方法在洋葱组织培养中的应用. 中国农学通报, 26 (21): 223-226.
- 王利民, 周毅, 陈龙友. 2002. 植物组织培养中消毒剂的运用. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 20 (1): 15-17.
- 吴良欢, 陶勤南. 1997. 水稻有机营养试验供试无菌苗的筛选和培育方法. 浙江农业大学学报, 23 (6): 711-715.
- 吴良欢, 陶勤南. 1999. 植物有机营养无菌培养试验方法的研究与应用. 土壤学报, 36 (4): 551-558.
- 杨岚, 唐琳, 刘建国, 吴家媛, 马欣荣, 杨德琴, 张剑, 关薇薇. 2008. 番茄种子两种灭菌法效果评价. 贵州医药, 32 (1): 26-28.
- 周光华. 1999. 蔬菜优质高产栽培的理论基础. 济南: 山东科学技术出版社: 580.
- Dodds J H, Roberts L W. 1996. Experiments in plant tissue culture. London: Cambridge University Press: 155.
- Pierik R L M. 1997. In vitro culture of higher plants. Netherlands: Kluwer Academic Publishers: 89-94.
- Rao A Q, Hussain S S, Shahzad M S, Bokhari S Y A, Raza M H, Rakha A, Majeed A, Shahid A A, Saleem Z, Husnain T, Riazuddin S. 2006. Somatic embryogenesis in wild relatives of cotton (*Gossypium* spp.). Journal of Zhejiang University Science B, 7 (4): 291-298.
- Sommer H E, Caldas L S, Crocorno O L, Aquarone E, Gottlieb O R. 1981. Plant tissue culture: methods and application in agriculture. Orlando: Academic Press: 379.