中图分类号: S532 文献标识码: B 文章编号: 1672-3635(2014)05-0273-04

栽培生理

次氯酸钠加吐温 80 对马铃薯外植体的灭菌比较试验

谢春霞, 尹明芳*, 陶彩丽

(大理州农业科学推广研究院粮食作物研究所, 云南 大理 671005)

摘要: 升汞是灭菌效果非常好的一种灭菌剂, 但它是有剧毒的重金属盐灭菌剂, 对人畜有极强的毒性, 且容易污染环境。为了寻找对马铃薯外植体安全有效的灭菌剂, 试验通过对马铃薯外植体, 用次氯酸钠溶液与添加吐温 80 的次氯酸钠溶液不同浓度、不同时间处理后, 与升汞处理相比较成苗率、感染率和褐化率。试验结果表明, 加 2% 吐温 80 的 11% 次氯酸钠溶液处理 30 min, 对马铃薯外植体的灭菌效果最好, 其成苗率高于 0.1% 升汞处理后的成苗率; 加 2% 吐温 80 的 13% 次氯酸钠溶液处理 20 min 后的灭菌效果也较好, 成苗率略低于 0.1% 升汞处理后的成苗率。

关键词: 吐温 80; 次氯酸钠; 马铃薯; 外植体; 灭菌

Comparative Trial of Sterilizing Potato Explant with Sodium Hypochlorite Added with Tween 80

XIE Chunxia, YIN Mingfang*, TAO Caili

(Dali Institute of Agricultural Sciences and Extension, Institute of Food Crops, Dali, Yunnan 671005, China)

Abstract: Mercuric chloride is one of the good explant sterilants, but it is poisonous to human beings and animals and contaminates environments due to its heavy metal salt. In order to find a safe and an effective potato explant sterilant, this experiment compared mercuric chloride, sodium hypochlorite and sodium hypochlorite added with Tween 80 in different concentrations and different sterilization time for seedling rate, contamination rate and browning rate of potato explants. The results showed that potato explants treated with 11% sodium hypochlorite added with 2% Tween 80 for 30 min gave higher seedling rate than 0.1% mercuric chloride; 13% sodium hypochlorite added with 2% Tween 80 treatment for 20 min also gave acceptable results though the seedling rate was slightly lower than that of the control.

Key Words: Tween 80; sodium hypochlorite; potato; explant; sterilization

无菌外植体是组织培养成功的必要前提, 从田间或温室选取的植物材料, 要经过严格的表面灭菌处理, 再经无菌操作接种到培养基上, 才能进入培养室保存。用于外植体表面灭菌的灭菌剂不仅要能有效杀死微生物, 而且不能损伤植物组织, 选取什么样的灭菌剂及灭菌方法成为成功保存植物材料的关键。常用的灭菌剂有酒精、升汞、次氯酸钠、漂白粉、双氧水等^[1]。李丽容等^[2]用几种灭菌剂对蓝莓外植体进行灭菌发现, 70%

酒精 30 s + 0.1% 升汞 6 ~ 8 min 灭菌效果最好, 其次是 70% 酒精 30 s + 2% 次氯酸钠 8 ~ 10 min。莫良玉等^[3]用不同灭菌剂组合对水稻、小麦和豆科绿豆等种子进行灭菌, 发现 0.1% 氯化汞灭菌效果最好, 2% 次氯酸钠次之, 10% 双氧水最差。于静等^[4]用酒精+不同浓度次氯酸钠、氯化汞对积雪草进行灭菌发现, 75% 酒精 20 s + 0.1% 氯化汞 6 min 的灭菌效果最好, 可达到 86% 的成活率。

升汞即氯化汞, 其杀菌力极强, 被用作灭菌剂

收稿日期: 2014-07-24

基金项目: 大理州脱毒马铃薯良种繁育基地建设项目。

作者简介: 谢春霞(1984-), 女, 农艺师, 硕士, 主要从事马铃薯育种和组培研究。

*通信作者(Corresponding author): 尹明芳, 高级农艺师, 主要从事马铃薯育种与栽培技术研究, E-mail: chunxiacie9@163.com。

已有100多年历史,是被人们公认的灭菌效果最好的一种灭菌剂,但升汞是有剧毒的重金属盐灭菌剂,对人畜有极强的毒性,操作不当会对人体造成极大危害,且废弃物难于处理,容易污染环境。而次氯酸钠利用释放出的活性氯离子杀死细菌,处理后能自然降解,对植物和人无害,不会造成环境污染,是一种较安全的表面灭菌剂。李志亮等^[5]用次氯酸钠对高羊茅种子进行灭菌发现,用70%酒精30 s + 50%次氯酸钠20 min,即可达到灭菌目的。唐琳等^[6]用0.1%升汞和3%~4%次氯酸钠对番茄种子进行灭菌发现,相较于0.1%升汞,番茄种子灭菌以3%~4%次氯酸钠为佳。王丹等^[7]用升汞和次氯酸钠对亮叶忍冬外植体进行灭菌发现,亮叶忍冬茎段最佳的灭菌药剂是2%次氯酸钠,处理15 min。袁源等^[8]用几种灭菌剂对青天葵感染组培材料进行处理发现,5%次氯酸钠溶液灭菌10 min,不仅不会造成青天葵培养材料的损伤,还能较好的抑制污染。

表面活性剂具有固定的亲水亲油基团,可消除表面灭菌剂与外植体的两相界面,增加灭菌剂在外植体表面的附着性和沉积量,提高有效成分在水分条件下的释放速度和扩展面积,从而达到增加灭菌效果的作用。邹永梅和黄雪方^[9]对万寿菊外植体进行灭菌发现,20%的84消毒液处理30 min与70%酒精30 min + 0.15%氯化汞处理10 min的灭菌效果均较好,且84消毒液灭菌效果明显好于次氯酸钠溶液,虽然两者有用成分都为次氯酸,但84消毒液中含有表面活性剂十二烷基磺酸钠,所以能在较短时间内杀灭细菌、病毒、细菌芽孢等。张瑞越等^[10]用不同灭菌剂对油菜种子灭菌发现,次氯酸钠、次氯酸钙和双氧水添加吐温80后,其灭菌效果都明显好于未添加吐温80时的灭菌效果。所以在灭菌剂中添加适量表面活性剂可望提高灭菌剂的灭菌效果。吐温80即聚山梨酯,是一种两亲型非离子型表面活性剂,能与水、甲醇、乙醇、氯仿、乙酸乙酯相混溶,因其具有较好的稳定性,结构上不易解离,不易受电解质和pH的影响,毒性较小,所以在日常生活的诸多领域得以广泛应用^[11]。

本试验通过用次氯酸钠溶液和添加吐温80的次氯酸钠溶液,设置不同浓度、不同处理时间,对马铃薯外植体进行表面灭菌,希望找到适于马铃薯外植体的安全有效的灭菌方法。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

试验于2014年6~7月在大理州农业科学推广研究院粮食作物研究所组培室进行。

1.2 试验材料

1.2.1 植物材料

本试验共3个马铃薯材料,分别为杂交后代‘10-2-8’、自交实生籽后代‘07.8.22’和‘07.8.18’,于3月份从田间收获3个马铃薯材料的块茎,置于室内常温下待其发芽,当芽长到1~1.5 cm时,取芽作为试验外植体材料。

1.2.2 灭菌剂

75%酒精,升汞溶液(0.1%氯化汞),11%次氯酸钠溶液,13%次氯酸钠溶液,11%次氯酸钠溶液+2%吐温80,13%次氯酸钠溶液+2%吐温80。

1.3 试验方法

1.3.1 预处理

分别从3个马铃薯材料‘10-2-8’、‘07.8.22’、‘07.8.18’的块茎上选取长度1~1.5 cm的幼芽各12份,每份11~12个,分别放入小烧杯,在自来水上冲洗10 min,然后转入超净工作台上备用。

1.3.2 灭菌处理

外植体的灭菌在超净工作台上进行。灭菌处理分为两个组: I组和II组,12个处理: 处理1~12。I组,75%酒精处理20 s后,分别用11%和13%次氯酸钠溶液处理,处理时间为20,25,30 min,共6个处理,即处理1~6; II组,75%酒精处理20 s后,分别用加2%吐温80的11%和13%次氯酸钠溶液处理,处理时间为20,25,30 min,共6个处理,即处理7~12。75%酒精处理后用无菌水冲洗3次,灭菌剂处理后用无菌水冲洗5次。

1.3.3 对照

分别从3个马铃薯材料的块茎上选取长度1~1.5 cm的幼芽各1份,每份11~12个,在自来水上冲洗10 min,然后转入超净工作台上,75%酒精处理20 s,无菌水冲洗3次,0.1%氯化汞处理5 min,无菌水冲洗5次。

1.3.4 接种

将每个处理后材料剪去芽体根部,接种于MS培养基上,每个处理接种3瓶,每瓶培养基分散接种3个芽体。接种完毕,置于培养架上,弱光下保

存。1 周后统计成苗率、感染率、褐化率。

1.3.5 试验统计

分别将 12 个处理中每个处理的 3 个马铃薯材料的成苗外植体数、污染外植体数、褐化外植体数相加, 计算出各个处理的平均成苗率、污染率、褐化率。

$$\text{成苗率}(\%) = (\text{成苗外植体总数} / \text{接种外植体总数}) \times 100$$

$$\text{感染率}(\%) = (\text{感染外植体总数} / \text{接种外植体总数}) \times 100$$

$$\text{褐化率}(\%) = (\text{褐化外植体总数} / \text{接种外植体总数}) \times 100$$

表 1 不同处理的灭菌效果比较

Table 1 Comparison of sterilization effect of different treatments

分组 Group	处理 Treatment	次氯酸钠浓度 Solution treatment	时间 (min) Time	接种数 (个) Inoculated explant	成苗率 (%) Seedling rate	感染率 (%) Contamination rate	褐化率 (%) Browning rate	成苗率排名 Rank of seedling rate
I 组	1		20	27	33.3	63.0	3.7	13
	2	11% NaClO	25	27	40.7	51.9	7.4	12
	3		30	27	66.7	29.6	3.7	5
	4		20	27	40.7	44.4	14.8	11
	5	13% NaClO	25	27	59.3	29.6	11.1	6
	6		30	27	55.6	29.6	14.8	8
II 组	7		20	27	51.9	40.7	7.4	9
	8	11% NaClO	25	27	66.7	22.2	11.1	4
	9		30	27	85.2	11.1	3.7	1
	10		20	27	70.4	7.4	22.2	3
	11	13% NaClO	25	27	55.6	14.8	29.6	7
	12		30	27	48.1	7.4	44.4	10
CK	13	0.1% HgCl ₂	5	27	77.8	3.7	18.5	2

2 结果与分析

2.1 吐温 80 对马铃薯外植体灭菌效果的影响

试验结果表明, I 组(次氯酸钠溶液)和 II 组(加吐温 80 的次氯酸钠溶液)对马铃薯外植体的灭菌效果存在一定差异, 主要表现在成苗率、感染率、褐化率三个方面。由表 1 可以看出, 浓度 11% 处理 20, 25, 30 min 和浓度 13% 处理 20 min 时, II 组马铃薯外植体的成苗率明显好于 I 组的成苗率; 而浓度 13% 处理 25 和 30 min 时, II 组的成苗率低于 I 组的成苗率。在浓度为 11%、13% 处理 20, 25, 30 min 时, II 组的感染率均明显低于 I 组的感染率。另外, 浓度 11% 处理 20 和 25 min, 浓度 13% 处理 20, 25, 30 min 时, II 组的褐化率高于 I 组的褐化率; 浓度 11% 处理 30 min 时, 两者褐化率相同。

以上结果表明, II 组浓度 11% 处理 20, 25, 30 min 和浓度 13% 处理 20 min 的成苗率高于 I 组; 而在浓度 13% 处理 25 和 30 min 时, 虽然污染率低于 I 组, 但褐化率明显高于 I 组, 所以成苗率反而低于 I 组。

2.2 不同浓度灭菌剂对马铃薯外植体的灭菌效果

由表 1 可知, 同一灭菌剂, 不同浓度对马铃薯外植体的灭菌效果存在一定差异。其中, I 组, 处理 20 和 25 min 后, 浓度 13% 处理时的成苗率高于浓度 11% 处理时的成苗率; 而处理 30 min 后, 由于 13% 处理时的褐化率高于 11% 处理时的褐化率, 所以 13% 处理时的成苗率反而低于 11% 处理时的成苗率。II 组, 处理 20 min 后, 13% 的成苗率高于 11% 的成苗率; 而处理 25 和 30 min 后, 虽然 13% 的感染率低于 11% 的感染率, 但由于 13% 的褐化率高于 11% 的褐化率, 所以 13% 的成苗率反而低于

11%的成苗率。说明用灭菌剂灭菌时,并不是浓度越高灭菌效果越好,而要考虑低浓度、长时间和高浓度、短时间的组配。

2.3 不同灭菌时间对马铃薯外植体的灭菌效果

由表1可知,同一灭菌剂、不同时间对马铃薯外植体灭菌效果存在一定差异。其中,Ⅰ组,浓度11%处理30 min的成苗率最高,而浓度13%时,处理25 min的成苗率最高。Ⅱ组,浓度11%处理30 min的成苗率最高,浓度13%时,处理20 min的成苗率最高,处理25和30 min时,处理时间越长褐化率越高,成苗率反而越低。所以,在灭菌中选择处理时间,不仅要能保证低污染率,还要避免处理时间过长导致的高褐化率。

2.4 与对照升汞的灭菌效果比较

由试验结果计算得出,对照升汞处理后的成苗率、感染率、褐化率分别为77.8%、3.7%、18.5%。由表1可知,12个处理中,浓度11%次氯酸钠溶液+2%吐温80处理30 min的成苗率最高为85.2%,其感染率、褐化率分别为11.1%、3.7%;浓度13%次氯酸钠溶液+2%吐温80处理20 min的成苗率次之为70.4%,其感染率、褐化率分别为7.4%、22.2%。与对照相比,浓度11%次氯酸钠溶液+2%吐温80处理30 min的成苗率高于对照,浓度13%次氯酸钠溶液+2%吐温80处理20 min的成苗率略低于对照。因此,在对马铃薯外植体进行灭菌时,可以选择加吐温80的适宜浓度的次氯酸钠溶液。

3 讨论

升汞杀菌力强,是一种应用较广泛的杀菌剂,但因其是有剧毒的重金属盐杀菌剂,对人畜有极强的毒性,且不易降解,对环境容易造成严重污染,所以不适合作为首选的表面灭菌剂。大量研究^[2,3,5-7]表明,次氯酸钠是一种灭菌效果较好的表面灭菌剂,只要针对不同植物外植体,选取适宜的浓度和灭菌时间,就可能收到较好的灭菌效果。吐温80即聚山梨酯,是一种非离子型表面活性剂,由本试验可知,它可以增加次氯酸钠对马铃薯外植体的灭菌效果,在次氯酸钠对马铃薯外植体灭菌中可作为增效剂适

量添加。

试验结果表明,加2%吐温80的11%次氯酸钠溶液处理30 min,对马铃薯外植体的灭菌效果最好,其成苗率高于0.1%升汞处理后的成苗率;加2%吐温80的13%次氯酸钠溶液处理20 min后的灭菌效果也较好,其成苗率略低于0.1%升汞处理后的成苗率。所以,在对马铃薯外植体进行表面灭菌时,考虑到人畜安全 and 环境保护,可优先选择加吐温80的次氯酸钠溶液。本试验还发现,由于次氯酸钠溶液极不稳定,易分解,随着放置时间的延长,次氯酸钠溶液中的有效氯含量逐渐减少,造成次氯酸钠溶液对马铃薯外植体的表面灭菌效果大打折扣,所以在用次氯酸钠溶液进行外植体表面灭菌时,最好现用现配,且注意低温避光保存。

[参 考 文 献]

- [1] 卢翠华, 邸宏, 张丽莉. 马铃薯组织培养原理与技术 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2009.
- [2] 李丽容, 金正开, 赖联森. 不同灭菌条件对蓝莓组培影响试验 [J]. 中国园艺文摘, 2012(2): 10-11.
- [3] 莫良玉, 吴良欢, 陶勤南. 植物有机营养研究中供试种子组合灭菌方法比较 [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2000, 26(6): 643-646.
- [4] 于静, 谢会兰, 李光辉, 等. 积雪草组织培养外植体的灭菌方法 [J]. 湖南科技学院学报, 2010, 31(12): 52-54.
- [5] 李志亮, 叶嘉, 杨杰, 等. 高羊茅组培再生体系建立的研究 [J]. 邯郸学院学报, 2006, 16(3): 60-63.
- [6] 唐琳, 刘建国, 马欣荣. 两种灭菌方法对番茄种子灭菌效果的评价 [J]. 种子, 2008, 27(9): 17-18.
- [7] 王丹, 李洪娜, 骆建霞, 等. 亮叶忍冬外植体灭菌方法的研究 [J]. 北方园艺, 2010(6): 150-152.
- [8] 袁源, 何瑞, 詹若挺. 青天葵组培扩繁中的污染控制初探 [J]. 现代中药研究与实践, 2010, 24(2): 25-27.
- [9] 邹永梅, 黄雪方. 不同消毒剂对万寿菊外植体灭菌效果的影响 [J]. 江苏教育学院学报, 2011, 27(4): 25-27.
- [10] 张瑞越, 季勤, 朱阳阳. 不同消毒剂对油菜种子消毒效果的比较 [J]. 淮阴师范学院学报: 自然科学, 2011, 10(2): 127-133.
- [11] 谭志高, 巢志茂, 刘海洋, 等. 聚山梨酯80的化学稳定性研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 251-254.