

除虫菊组织培养中种子及幼苗消毒方法研究

张 强¹, 李 琰^{1, 2}, 张 兴¹

(1. 西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨凌 712100;

2. 西北农林科技大学 生命学院, 陕西 杨凌 712100)

提 要:进行了 HgCl₂、次氯酸钠以不同浓度、不同消毒时间对除虫菊种子和幼苗消毒效果研究。结果表明:对除虫菊种子消毒以 10% 次氯酸钠处理 30 min 效果较好, 发芽率达 62.22%, 污染率仅为 3.33%。除虫菊幼苗消毒以 0.1% HgCl₂ 处理 4min 效果较好, 幼苗成活率达 90%。

关键词:除虫菊; HgCl₂; 次氯酸钠; 消毒方法

在农药研究中与环境有较高和谐度的植物性杀虫剂是当前研究的重要方向。植物性杀虫剂作为生物源农药的一个组成部分^[1], 具有明显的优势, 它取之于自然, 用之于自然, 低毒、低残留、专一性强、对非靶标生物及环境安全, 害物不易产生抗药性, 在自然环境中易降解^[2, 3], 可降低或避免化学农药带来的“农药公害”, 这正符合现在人们对农药的要求及其将来的发展方向。从除虫菊 (*Pyrethrum cinerariifolium* Trev.) 花中提取的天然除虫菊素是优秀的植物性杀虫剂之一, 天然除虫菊素的商业重要性和除虫菊干花供应的不稳定性促使人们研究如何提高其产量或采用其他更高产的替代方法来进行天然除虫菊素的生产, 采用生物技术手段进行除虫菊素生产的研究越来越受到人们的重视。笔者对除虫菊种子及幼苗的消毒方法进行了研究, 以期今后通过采用组培等生物技术生产除虫菊素提供有关技术措施。

1 材料与方法

1.1 试验材料

除虫菊种子: 采自杨凌国家西部植化工程研究中心的植物资源圃。

除虫菊幼苗: 将除虫菊种子用温水浸泡 24h 后弃去漂浮的种子, 将下沉种子直接播于花盆中, 及时浇水到真叶开始长时使用。

HgCl₂: 分析纯, 北京红星化工厂。

次氯酸钠: 分析纯, 天津试剂三厂。

1.2 试验方法

种子消毒: 选用无病虫害、饱满、成熟度高且一致的除虫菊种子, 用温水浸泡 24h 后弃去漂浮

的种子, 将沉下种子用自来水冲洗后在超净工作台上用 75% 酒精表面处理 30s, 无菌水冲洗 3 次, 分别用不同浓度的 HgCl₂ 和次氯酸钠溶液处理不同时间, 消毒完后用无菌水冲洗 5 次, 然后接种于盛有 MS 无激素固体培养基上, 每处理接种 30 瓶, 每瓶接 3 粒消毒种子。随后置于光照培养箱培养 (温度 25 ± 2℃, 光照时间 12 h/d, 光照强度 (3 000 ~ 4 500 lx), 30d 后检查除虫菊种子的发芽数及污染数, 计算发芽率和污染率。

幼苗消毒: 把开始长出真叶的除虫菊幼苗, 自下胚轴剪下, 自来水冲洗 2h, 75% 酒精表面处理 30s, 无菌水冲洗 3 次, 用不同浓度次氯酸钠、HgCl₂ 溶液处理不同时间, 消毒完后用无菌水冲洗 5 次, 接种于盛有 MS 无激素固体培养基上, 每处理接种 30 瓶, 每瓶接种 1 株。而后置于光照培养箱, 培养 10d 后调查污染及成活情况, 计算发芽率 (成活率) 和污染率。

发芽率 (%) = (发芽种子或成活幼苗数 / 接种数) × 100

污染率 (%) = (污染瓶数 / 接种瓶数) × 100

以发芽率 (成活率) 和污染率为指标评价消毒效果。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 HgCl₂ 对除虫菊种子消毒效果

HgCl₂ 浓度为 0.1% 时, 4 个不同时间处理的种子逐渐变黑, 失去光泽, 发芽率均为 0。消毒 4min, 污染数量为 1 瓶, 占 3.33%; 2min 处理后污染数量为 5 瓶, 占总数的 16.67%。

当 HgCl₂ 浓度为 0.05% 时, 各个处理材料亦

全部被杀死,可见 HgCl_2 对除虫菊种子灭菌效果良好,污染率较低,但除虫菊种子对其敏感,极易被杀死,因此不适于用此方法消毒。

2.2 不同浓度次氯酸钠对除虫菊种子消毒效果

以次氯酸钠为消毒剂时,种子消毒后呈黄白

色,有光泽,培养 3d 后开始从部分种子上长出杂菌,种子不能发芽。浓度为 3% 时和 6% 时,三个处理的污染率均比较高(表 1);浓度为 10% 时,消毒 30min 污染率仅为 3.33%,发芽率也比较高,此条件适宜除虫菊种子消毒。

表 1 不同浓度次氯酸钠对除虫菊种子消毒效果

次氯酸钠浓度(%)	消毒时间(min)	发芽个数(个)	发芽率(%)	污染数(瓶)	污染率(%)
3	10	1	1.11	28	93.33
3	20	5	5.56	25	83.33
3	30	18	20.00	22	73.33
6	10	4	4.44	27	90.00
6	20	17	18.89	21	70.00
6	30	28	31.11	12	40.00
10	10	21	23.33	18	60.00
10	20	32	35.56	8	26.67
10	30	56	62.22	1	3.33

2.3 不同浓度次氯酸钠对除虫菊幼苗消毒效果

以次氯酸钠为消毒剂对幼苗消毒时,消毒后幼苗失绿明显,接种 3~4d 后,逐渐复绿,部分材料已开始污染杂菌,虽然各个处理材料均未被杀死,但污染率均比较高(表 2)。浓度为 10% 时,对

除虫菊幼苗消毒 20 min、30 min 后,污染率仍高达 46.67%、36.67%,并且随着消毒时间的延长,幼苗失绿也比较严重,10% 消毒 30 min 的幼苗 15d 后才恢复生长。可见用次氯酸钠对除虫菊幼苗消毒效果不佳。

表 2 不同浓度次氯酸钠对除虫菊幼苗消毒效果

次氯酸钠浓度(%)	消毒时间(min)	成活植株数(株)	成活率(%)	污染植株数(株)	污染率(%)
3	10	0	0.00	30	100.00
3	20	3	10.00	27	90.00
3	30	7	23.33	23	76.67
6	10	5	16.67	25	83.33
6	20	11	36.67	19	63.33
6	30	14	46.67	16	53.33
10	10	13	43.33	17	56.67
10	20	16	53.33	14	46.67
10	30	19	63.33	11	36.67

2.4 不同浓度 HgCl_2 对除虫菊幼苗消毒效果

用 0.1% HgCl_2 处理除虫菊幼苗后,幼苗仍保持绿色,3~4d 后已有部分材料逐渐干枯死亡,随着消毒时间的延长,污染率得到了控制,但死亡率也随着消毒时间的延长而逐渐升高(表 3)。由此可见以 0.1% HgCl_2 对除虫菊幼苗进行消毒后的

污染率随着消毒时间的延长而降低,而死亡率却随着消毒时间的延长而升高;在 0.1% 浓度、消毒 4 min 的污染率和死亡率分别为 3.33%、6.67%,成活率达 90%,幼苗 5d 后就可以恢复生长,此条件适宜除虫菊幼苗的消毒。

表 3 0.1% HgCl_2 对除虫菊幼苗消毒效果

消毒时间(min)	杀死植株数(株)	死亡率(%)	污染植株数(株)	污染率(%)	成活植株数(株)	成活率(%)
2	0	0.00	9	30.00	21	70.00
4	2	6.67	1	3.33	27	90.00
8	13	43.33	0	0.00	17	56.67
10	18	60.00	0	0.00	12	40.00

恰恰相反,中油 821 最高,742 最低,这是因为作物苗期的生长和养分吸收主要是为以后的生长打基础,更多的养分吸收不一定在幼苗期表现出更高的生长量。

表 4 不同品种油菜苗期生物量、氮素吸收量、氮素生理效率

	生物量 (gDW)	氮素吸收量 (g)	氮素生理效率 (gDW/g)
742	23.4 a	1.121 a	20.8
湘油 15 号	16.2 b	0.707 b	22.9
汇油 50	11.2 c	0.451 c	24.8
中油 821	10.1 c	0.388 c	26.0

以上分析表明,在本试验(氮素供应正常)条件下,最大吸收速率高、根系活力强的品种 742 具有最高的氮素吸收能力及生长能力。当然,最大吸收速率高、离子亲和力强、根系活力强的品种是最理想的氮吸收效率高的品种,也是我们选育的目标^[15]。值得注意的是,不同品种之间的吸收动力学参数的比较要慎重,因为即使同一品种在不同生长阶段,或同一生长阶段但在不同生长时间其动力学参数也是变化的^[13]。

参考文献:

- [1] Adhikari T., Rattan R. K. Modelling zinc uptake by rice crop using a Barber—Cushman approach[J]. Plant and Soil, 2000, 227(2): 235~242.
- [2] Anthony D. M. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2003, 22(5): 453~470.
- [3] Kronzucker, H. J., Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M. Kinetics of NO₃— influx in spruce[J]. Plant physiology, 1995, 109,

319~326.

- [4] Rawat, S. R., Silim, S. N., Kronzucker, H. J., Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M. AtAMT1 gene expression and NH₄⁺ uptake in roots of Arabidopsis thaliana: Evidence for regulation by root glutamine levels[J]. Plant Journal, 1999, 19: 143~152.
- [5] 谢瑞芝,董树亭. 不同基因型玉米硫素吸收利用差异研究 I. 根系吸收动力学参数与品种对硫肥的响应[J]. 作物学报, 2002, 28(3): 345~350.
- [6] 倪晋山. 小麦吸收、累积硝酸根的品种间差异[J]. 植物生理学报, 1982, 8(3): 307~315.
- [7] 王宪泽,陶福占,程炳嵩,张国珍. 小麦对氮素形态适应性的生理分析[J]. 山东农业大学学报, 1990, 21(2): 87~90.
- [8] 韩士群,邹德乙. 稻苗在磁化营养液中生长状况及吸收 K⁺ 动力学研究简报[J]. 土壤通报, 2000, 31(4): 185~186.
- [9] 杨尚斌,孙义. 不同水稻品种 NH₄⁺ 和 NO₃[—] 吸收的动力学[J]. 土壤通报, 1991, 22(5): 222~224.
- [10] 高祖明,张春,倪金应等. 黄瓜等九种蔬菜与 NO₃[—]—N 亲和力的研究[J]. 南京农业大学学报, 1990, 13(1): 75~79.
- [11] Drew, M. C., Saker, L. R., Barber S. A., Jenkins W. Changes in the kinetics of phosphate and potassium absorption in nutrient—deficient barley roots measured by a solution—depletion technique[J]. Planta, 1984, 160(6): 490~499.
- [12] 刘秀珍,李韵珠. 玉米苗期硝酸离子吸收动力学参数的研究[J]. 土壤肥料, 1994(3): 21~24.
- [13] 田宵鸿,李生秀,王清君. 几种作物 NO₃[—] 吸收动力学参数测定方法初探[J]. 土壤通报, 2001, 32(1): 16~18, 31.
- [14] 邹琦主编. 植物生理生化实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1993.
- [15] Cerezo, M., Flors, V., Legaz, F. and Garcia—Agustin. Characterization of the low affinity transport system for NO₃[—] uptake by Citrus roots[J]. Plant Science, 2000, 160: 95~104.

(上接第 28 页)

3 小结与讨论

消毒是进行除虫菊组织培养的第一步基础工作。除虫菊种子在自然状态下发芽率较低,仅为 50%左右,且发芽缓慢,10d 左右才开始发芽,并且发芽不齐,一直延续到 20d 左右,仍有种子开始发芽。没有经过消毒处理的除虫菊种子在培养基上发芽仍需 10~15 d,并且极易污染。通过实验发现:以 10%的次氯酸钠为消毒剂,对除虫菊种子处理 30 min 后的污染率为 3.33%,发芽率为 62.22%,为处理除虫菊种子的最优处理;而以 0.05%、0.1% HgCl₂ 对除虫菊种子消毒后,虽然各处理的污染率均较低(污染率最高的是 0.05%浓度消毒 2 min 的 23.33%),但是经 HgCl₂ 处理后所有的除虫菊种子均被杀死,发芽率为 0,可见

除虫菊种子对 HgCl₂ 敏感,不适宜用 HgCl₂ 对除虫菊种子进行消毒。用次氯酸钠对除虫菊幼苗进行消毒处理后的污染率均较高,且幼苗失绿比较严重,恢复生长需要时间较长。而以 0.1%浓度的 HgCl₂ 对除虫菊幼苗消毒 4 min,污染率和杀死率比较低,并且恢复生长需要的时间较短,效果比较理想。因此,对除虫菊种子消毒处理应选择用 10%次氯酸钠处理 30 min,对除虫菊幼苗消毒处理应选择 0.1%浓度的 HgCl₂ 消毒 4 min。

参考文献:

- [1] 侯学文,谢建军,曾鑫年等. 生物技术在植物性杀虫剂研究开发中的应用[J]. 植物保护学报. 2001, 28(1): 77~82.
- [2] 张 兴. 试论无公害农业[J]. 中国农学通报. 1996, 12(5): 6~9.
- [3] 刘长令. 植物杀虫剂前景广阔[J]. 世界农业. 1998, (5): 36~37.