

豆类植物研究

主持人开栏寄语:豆类及其制品是人类食物蛋白的良好来源,是人类三大食用作物之一,具有非常高的营养价值和生理功能特性。食用豆类(food legumes)是以收获籽粒兼作蔬菜供人类食用的豆科作物之统称,均属豆科(Leguminosae)蝶形花亚科(Papilionoideae)。我国是豆类植物的生产大国和消费大国,遗传资源丰富,栽培历史悠久,是一些豆类植物的起源或次生起源中心,栽培面积大。据不完全统计,近年生产面积超过670万 hm^2 ,产品市场需求旺盛。除鲜食外,还可作干制、腌制等加工,制作芽菜,作为食品(如豆奶、纳豆等)、油料、药物等加工原料。

由于种种原因,与主要农作物相比,食用豆类研究相对滞后,不能适应社会经济发展和人民生活水平提高的需要,也未能充分理解和发掘豆类植物资源。目前,新选育品种性状的多元化需求与遗传背景狭窄之间的矛盾有待化解;豆类植物绿色生产中的食品安全隐患亟需消除;独特的培肥地力生态功能期待发挥;拉长产业链的豆制品和深度加工产品的潜能需要释放。2011年,研究人员依托江汉大学组建了湖北省豆类(蔬菜)植物工程技术研究中心,2015年又组建了湖北省食用豆类植物自然科技资源中心和豆类植物研究与利用创新团队,开展了食用豆类植物种质资源的收集、整理、鉴定、保存等基础性工作和遗传改良、优质高效栽培、培肥地力生态应用、产品保鲜加工与质量安全检测等研发工作。目前的主要任务是:建设省级食用豆类植物资源中心,构建种质资源库和数据库共享平台;以现代生物技术为手段,着力研究解决豆类植物安全生产与资源有效利用中的重大关键性、基础性和共性技术问题,如遗传多样性保护、优异基因挖掘、抗虫豇豆和脱毒菜豆等种质创新与新品种选育;发展豆类植物规模化生态应用,研发高品质豆类营养食品、生物制剂和植物源生物农药等。

为进一步推动豆类植物研究与利用工作,湖北省豆类(蔬菜)植物工程技术研究中心、湖北省食用豆类植物自然科技资源中心与《江汉大学学报(自然科学版)》联袂开设“豆类植物研究”专栏,以展示最新研究进展,促进学术交流,彰显学科特色。该专栏将追踪科技前沿、关注民生热点、聚焦产业关键、体现学科交叉、促进学术进步、激励创新创业。真诚期待国内外名家与新秀关注该栏目,协力构建学术探讨和争鸣之高地。

栏目主持人:陈禅友

不同消毒处理对豇豆种子无菌培养的效应

吴 华^{1,3}, 高志鹏^{1,2}, 陈 高^{1,2}, 宋 伦^{1,2}, 陈禅友^{*1,2}

(1. 江汉大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430056; 2. 湖北省豆类(蔬菜)植物工程技术研究中心, 湖北 武汉 430056; 3. 北京工商大学 理工学院化妆品系, 北京 100048)

摘 要:比较了不同消毒剂和处理方式对“龙纹”豇豆种子的消毒效果及无菌生长的效应。结果表明:先消毒再浸种的效果较好,其中0.1%的升汞消毒8 min的效果最佳(污染率为11%,萌发率为77%)。消毒后将种子接种在附加有300 mg/L头孢噻肟钠的培养基中,能有效减少培养过程中的污染率(7%),同时不影响无菌幼苗的生长,10 d后85%无菌苗株高可达3 cm以上。

关键词:豇豆;消毒剂;升汞;次氯酸钠;头孢噻肟钠;无菌培养

中图分类号:S643.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-0143(2015)05-0389-04

DOI:10.16389/j.cnki.cn42-1737/n.2015.05.001

收稿日期:2015-06-01

基金项目:江汉大学博士科研启动基金资助项目(2012025)

作者简介:吴 华(1978—),女,副研究员,博士,研究方向:园艺植物种质资源创新及利用。

*通讯作者:陈禅友(1963—),男,教授,博士,研究方向:植物遗传学。E-mail:ccy@jhun.edu.cn

Effects of Different Disinfectant on Cowpea Seeds' Sterilization Culture

WU Hua^{1,3}, GAO Zhipeng^{1,2}, CHEN Gao^{1,2}, SONG Lun^{1,2}, CHEN Chanyou^{*1,2}

(1. School of Life Sciences, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei, China; 2. Hubei Province Engineering Research Center for Legume Plants, Wuhan 430056, Hubei, China; 3. Cosmetics Department, School of Science, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: The effects of different seed disinfection methods on Longwen cultivar cowpea seeds were investigated. Optimum results were achieved by surface sterilizing the seeds with 0.1% mercury bichloride solution for 8 minutes (contamination rate 11%, germination rate 77%). The contamination rate can be efficiently decreased by adding 300 mg/L cefotaxime sodium to the medium after surface sterilization (7%). This method does not affect the normal growth of plants, 85% of plants reached the height of 3 cm after 10 days.

Keywords: cowpea; disinfectant; mercury bichloride; sodium hypochlorite; cefotaxime sodium; aseptic culture

豇豆(*Vigna unguiculata*)是豆科豇豆属的耐热性蔬菜,是7~9月国内蔬菜淡季上市的主要蔬菜之一,受到人们的青睐。豇豆极易受到病虫害的侵袭,生长过程中的病害多由种子自身携带的病菌引起。生产者为了控制病虫害会过多地使用农药,既造成污染环境又导致农药残留超标等食品安全问题,严重制约了豇豆的产量与品质。

利用组织培养来构建豇豆高效再生体系,可以消除栽培季节、地域性等自然条件的影响,培育大量无病虫害的优良无菌苗,从初期减少病虫害的侵染概率,为高品质、高产量、低农药残留的豇豆生产提供可能性。而种子是主要和常用的外植体之一,外植体的选择要以污染少易启动培养为原则^[1]。如何有效对其进行消毒处理,使得种子带菌量减少,获得大量具有良好生长状态的无菌苗是豇豆组织培养的首要环节。本研究旨在探讨不同消毒剂对豇豆种子无菌培养时消毒效果及萌发的影响,以期找到高效且稳定的消毒方法,为豇豆无菌苗的培育提供参考和借鉴。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以“龙纹”豇豆的种子为材料,研究不同消毒剂及消毒时间对豇豆种子无菌培养时消毒的影响。本试验中所用的“龙纹”豇豆种子,均采自湖北省豆类(蔬菜)植物工程技术研究中心武汉市永安种植基地。

种子的具体收集方法如下:将同一批成熟豆荚收集后,在晾晒场中干燥,去除豆荚及杂质,将种子继续晒干后密封保存在4℃的冷库内待用。

1.2 培养基及培养条件

含有1/2大量元素强度的Murashige and Skoog培养基(MS培养基)被用作为本试验的基本培养基。培养基中添加了3%(w/v)蔗糖(国药)和0.9%(w/v)琼脂,在灭菌前将pH调至5.8,而后在121℃和1.1 kg/cm²的条件下灭菌20 min。灭菌完后,在培养基降温至60℃未冷却前,添加已过滤灭菌的抗生素头孢噻肟钠(cefotaxime sodium, Cef)0~500 mg/L,并分装到直径为9 cm的培养皿中。

所有的培养物都置于可调控的人工环境中,其中温度保持在(25±2)℃,光照强度为25 ul/(m²·s),光照周期为16 h L/8 h D。

1.3 试验方法

1.3.1 消毒处理组合的试验设计与方法 将无破损的种子放在玻璃培养瓶中,表面用单层纱布封口,在流水下冲洗0.5 h,然后将种子浸泡于温水中数小时,待种子完全吸胀。而后将吸胀的种子与干种子,在超净工作台上进行消毒灭菌。具体操作流程如下:分别用0.1%升汞(HgCl₂)或5%次氯酸钠(NaClO)处理种子8 min或者15 min,处理时充分振荡以增强杀菌效果。处理时间足够之后再无菌水冲洗3次,每次8 min,以彻底地去除残留的消毒剂。接种前,将消毒完毕的种子置于无菌滤纸上吸干多余水分。按

照每处理设3次重复,每重复5个培养瓶,每瓶接种5粒种子。

1.3.2 消毒后豇豆种子无菌培养的试验设计与方法 用上步试验中适宜的消毒方式处理后豇豆籽粒分别接种到含有头孢噻肟钠0、300、500 mg/L的1/2 MS培养基中,每处理设3次重复,每重复5个培养瓶,每瓶接种5粒种子。

1.4 统计学处理

接种5 d后分别对污染及萌发情况进行统计,并计算发芽势及发芽率。10 d后对萌发生长的幼苗的生长情况进行统计和比较,以均值和标准差的形式表现。

污染率=(污染数/接种数)×100%;

萌发率(GE)=(5 d时的出苗数/供试种子总数)×100%;

10 d后高于3 cm的苗数(GP)=(10 d时的出苗数/供试种子总数)×100%。

2 结果与分析

2.1 不同消毒剂、消毒方式和消毒时间对豇豆种子消毒效果的影响

试验过程中发现,“龙纹”豇豆种子浸种吸胀后,浸泡液较为浑浊。无论是干种子或吸胀的种子经NaClO消毒处理后,种皮褪色较为严重,消毒废液及清洗液均较HgCl₂消毒处理的浑浊。且经HgCl₂处理的干种子在消毒处理后的浸泡吸胀的过程中,其浸泡液浑浊度也较轻。

从5 d后的消毒效果来看,相同消毒处理条件下,先消毒后浸泡的种子消毒效果较好,污染率差异有统计学意义($P < 0.01$),且先消毒后浸泡种子的萌发率较先浸泡后消毒的种子高,差异有统计学意义($P < 0.01$)(见表1)。在相同的预处理及消毒时间条件下,HgCl₂的消毒效果及萌发率均较NaClO的效果好,且差异有统计学意义($P < 0.01$)。综合分析比较显示:“龙纹”豇豆种子经HgCl₂消毒8 min再浸泡的消毒及萌发效果最佳,污染率为11%,萌发率为77%。

表1 不同的消毒剂和消毒时间对豇豆种子无菌培养消毒效果的影响

处理	消毒剂	消毒时间/min	5 d 污染率/%	5 d 萌发率/%
先消毒后浸泡	NaClO	8	67±0.53 ^{bb}	22±1.73 ^{ef}
		15	50±1.15 ^{cc}	35±1.15 ^{ld}
	HgCl ₂	8	11±0.58 ^{ee}	77±1.00 ^{aa}
		15	5±0.58 ^{ff}	43±1.00 ^{cc}
先浸泡后消毒	NaClO	8	78±2.08 ^{aa}	18±0.00 ^{efg}
		15	65±1.53 ^{bb}	16±1.15 ^{fg}
	HgCl ₂	8	17±1.73 ^{ld}	56±1.53 ^{bb}
		15	10±0.58 ^{efe}	30±1.53 ^{de}

注:大写字母不同表示差异有统计学意义($P < 0.01$),小写字母不同表示差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 不同浓度头孢对消毒后豇豆种子的污染率和生长发育的影响

培养过程中发现,即使消毒效果在第5天最好的处理,在第10天后污染率也明显增高约20%。为了避免污染率上升,将“龙纹”豇豆种子经HgCl₂消毒8 min再浸泡后,接种在附加有不同浓度Cef的培养基中。接种10 d后的结果表明:300 mg/L和500 mg/L Cef抑菌效果显著,但两者间差异无统计学意义(见表2)。Cef会使种子的萌发时期延迟1~2 d,与对照相比,幼苗下胚轴在500 mg/L的Cef条件下明显缩短增粗,上胚轴短小,叶片较大。而300 mg/L的Cef对幼苗的形态影响不明显。因此,培养基中添加300 mg/L Cef效果最佳。

表2 10 d后不同浓度头孢噻肟钠对接种的豇豆种子污染率和生长的影响

头孢噻肟钠/(mg·L ⁻¹)	污染率/%	3 cm 以上植株/%
0	37±2.0 ^{bb}	58±2.0 ^{cc}
300	7±1.0 ^{aa}	85±3.6 ^{aa}
500	5±2.1 ^{aa}	74±2.0 ^{bb}

注:大写字母不同表示差异有统计学意义($P < 0.01$),小写字母不同表示差异有统计学意义($P < 0.05$)。

由此可见:豇豆种子采用0.1% HgCl₂消毒8 min后,再接种到含有300 mg/L Cef的1/2 MS培养基中,可以在保持较好长势的同时获得较低的污染率。

3 讨论

浸种是加速种子吸胀,促进种子发芽的常用方法^[2]。浸种不仅能改善种皮的透水、透气性,还可以去除抑制物,增强种子内酶的活性,使胚的呼吸作用增强,提高种子萌发率和一致性^[3-4]。然而,种子吸胀的同时,也会导致内含物外渗,随着浸种时间的延长,豇豆种子中的电解质、游离氨基酸、蛋白质、可溶性糖外渗严重,导致幼苗弱小,营养不良^[5]。本研究发现,“龙纹”豇豆种子消毒前浸泡,浸泡液及消毒清洗液都较消毒后浸泡的浑浊,且萌发率较低。这可能是浸种过程中内含物渗出较多,且前期的浸泡加强了种皮的透水性,种子活化,消毒剂更易深入种子内部,对种子造成了一定的伤害或是消毒剂残留较难去除,最终影响了种子的正常萌发。

次氯酸钠和升汞是组织培养常用的两种消毒剂^[6]。杜雪玲等^[1]发现0.1%升汞对土沉香种子的消毒效果较次氯酸钠好,后期培养愈伤诱导率高、污染率低。刘明稀等^[7]发现假俭草种子消毒处理时,次氯酸钠消毒效果比升汞好,更利于种子的萌发和幼苗的生长。次氯酸盐是通过次氯酸根离子的强氧化性进行消毒,且见光分解形成氯气,渗透性较强^[8]。本研究发现,“龙纹”豇豆种子在次氯酸钠的处理中,不仅种皮脱色严重,且种子渗出物较多,这主要与次氯酸钠的强氧化性有关。升汞是利用重金属离子与细菌表面蛋白接触使其变性来进行消毒^[9]。本试验中发现,经升汞消毒的“龙纹”豇豆,种皮脱色程度较轻,种子内含物渗出较少,且污染率低、萌发率高、消毒效果较好,这与杜雪玲等^[1]的研究结果一致。

Cef是一种广谱性的抗生素,经常用于农杆菌介导的转基因操作中,抑制细菌的生长^[10]。张松等^[11]研究表明Cef的浓度超过100 mg/L就能够对大白菜根和芽的分化造成影响。王丽等^[12]研究表明Cef的浓度在300 mg/L以下时能够让烟草叶片分化率小幅下降,大于400 mg/L时叶片分化率进一步下降。青霉素与Cef均属于β-内酰胺类抗生素,袁华玲^[13]发现青霉素能够促进豇豆下胚轴的生长,同时使得下胚轴增粗。本研究中500 mg/L的Cef对豇豆幼苗的生长发育有抑制作用,且下胚轴增粗,而300 mg/L的Cef对试验中豇豆幼苗的生长无明显抑制作用,但同样使得下胚轴明显增粗。由此可见,不同植物对于抗生素的敏感度存在差异^[14]。

参考文献(References)

- [1] 杜雪玲,张振霞,余如刚,等. 植物组织培养中的污染成因及其预防[J]. 草业科学,2005,22(1):24-27.
- [2] HELPLER P K, WAYNE R. Calcium and plant development [J]. Ann Rev Plant Physiol, 1985, 36(4):397-439.
- [3] 戎聪敏. 不同条件下药剂浸种对油菜发芽率及幼苗长势的影响[D]. 武汉:华中农业大学,2013.
- [4] 谭玲玲,胡正海. 不同浸种处理对桔梗种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 中草药,2013(4):468-472.
- [5] 傅家瑞. 种子生理[M]. 北京:科学出版社,1985.
- [6] 胡凯,张立军,白雪梅,等. 植物组织培养污染原因分析及外植体的消毒[J]. 安徽农业科学,2007,35(3):680-681.
- [7] 刘明稀,郭振飞. 不同消毒方式对假俭草种子愈伤诱导的影响[J]. 草地学报,2012,20(2):383-388.
- [8] 唐琳,刘建国,马欣荣,等. 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.
- [9] 汪腾越,周再知,裘珍飞,等. 土沉香组织培养外植体消毒方法的研究[J]. 中南林业科技大学学报,2012,32(3):44-48.
- [10] 康杰芳,王喆之. 头孢霉素类抗生素在转基因烟草中作用的初步研究[J]. 西北植物学报,2003,23(1):60-63.
- [11] 张松,温孚江,朱常香,等. 抗生素对大白菜组织培养形态发生的影响[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2000,31(4):385-388.
- [12] 王丽,张俊莲,王蒂,等. 抗生素对根癌农杆菌的抑菌效果及对烟草叶片分化的影响[J]. 中国烟草学报,2006,12(1):32-37.
- [13] 袁华玲. 青霉素对豇豆种子萌发及下胚轴生长的影响[J]. 安徽农业科学,2003,30(4):554-555.
- [14] 茆永萍,戴铃莺,陈青建,等. 不同抗生素对矮牵牛叶片培养的敏感性试验[J]. 安徽农业科学,2012,40(33):16096-16098.

(责任编辑:陈 旷)