

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2006)06-0349-03

微波灭菌及液体培养技术研究

梁霞, 李群, 胡晓军

(山西省农业科学院产品综合利用研究所, 山西 太原 030031)

摘要: 研究了影响微波灭菌的因素和效果以及用液体培养基代替固体培养基培养脱毒马铃薯苗的方法和效果。证明了用频率为 2 450 MHz、功率为 1 200 W 的微波炉, 在 300 mL 的培养瓶中装入 80 mL·瓶⁻¹ 的培养液, 无论固体培养基还是液体培养基, 在 80% 以上的功率, 灭菌 10 min, 便可实现很好的灭菌效果。在液体培养基中用海棉作切段的支撑物, 苗的成活率可达到 96%。

关键词: 组织培养; 微波灭菌; 液体培养

组织培养技术是生物技术的重要基础。近 10 年来, 随着生物技术的飞速发展, 植物脱毒技术在农业、林业和中草药领域得到广泛的应用, 尤其是脱毒马铃薯的快繁技术得到大力推广。

组织培养技术是众多技术的集成, 组织培养的灭菌技术, 目前均是采用高压蒸汽灭菌方法, 其灭菌设备较贵, 费用较高, 有待进一步改进。植物组织培养所用的培养基, 目前几乎都用固体

培养基, 其中起固定作用的琼脂就占到全部培养基成本的 80% 以上, 同样有进一步改进的必要^[1-2], 笔者对微波灭菌及液体培养技术进行了研究, 供同行借鉴。

1 材料与方法

1.1 仪器

家用微波炉: 频率 2 450 MHz、功率 1 200 W; 高压蒸汽灭菌锅: 容积 60 L, 功率 6 KW; 电子天平: 精度 0.01 g; 300 mL 的玻璃瓶。

1.2 材料及试剂

试验材料采用由山西省农业科学院高寒区作物

收稿日期: 2006-05-24

基金项目: 山西省专利资助项目(20051016)

作者简介: 梁霞(1975-), 女, 助理研究员, 从事植物组织培养和农产品加工工作。

50%多菌灵可湿性粉剂喷雾薯块效果次之, 平均防效为 43.81%; 果蔬防腐保鲜剂烟雾剂熏蒸薯块位居第三, 平均防效为 32.44%; 霜霉疫净烟雾剂熏蒸薯块居第四位, 平均防效为 31.75%; 10%百菌清烟雾剂熏蒸薯块居第五位, 平均防效 31.36%; 农用链霉素喷雾薯块效果最差, 平均防效为 28.03%。

经方差分析表明, 58%甲霜灵锰锌可湿性粉剂喷雾薯块处理与 50%多菌灵可湿性粉剂喷雾处理薯块之间存在显著差异, 与其它各处理间存在极显著差异, 其余药剂处理之间无明显差异。

3 讨论

从总体防效看, 以上药剂处理薯块与对照相比,

均有一定的防治效果, 但都不够理想, 防治效果最好的甲霜灵锰锌, 平均防效为 59.89%, 但不能全面控制马铃薯贮藏期该病害的危害。能有效缓解该病害的扩展蔓延。为了科学有效的防治马铃薯贮藏期病害, 目前在采用 58%甲双灵锰锌预防马铃薯贮藏病害的同时, 需进一步做好防治药剂筛选试验工作, 筛选出更加有效的防治药剂, 减少贮藏期马铃薯损失。

[参考文献]

- [1] 戴芳澜. 中国真菌总汇 [M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [3] 何苏琴, 金秀琳, 魏周全, 等. 甘肃定西地区马铃薯块茎干腐病病原真菌的分离鉴定 [J]. 云南农业大学学报. 2004, (5): 551.

研究所提供的脱毒马铃薯苗; 试剂为 MS 培养基所需试剂, 全部为化学纯。

1.3 试验方法

1.3.1 微波灭菌技术的试验方法

用家用微波炉, 以组织培养中常用的 300 mL 的玻璃瓶为培养容器, 培养基有液体和固体两种。以时间、功率、培养基装量为因素, 设计时间 6 个水平, 分别为 4 min、6 min、8 min、10 min、12 min 和 14 min; 设计功率 4 个水平, 分别为 100%、80%、60% 和 40%; 培养基装量为 4 个水平, 分别为 60 mL、80 mL、100 mL 和 120 mL。进行多因素试验。

1.3.2 液体培养技术的试验方法

在培养容器中用塑料膜、海棉、塑料膜加支架

和海棉加支架 4 种处理方法, 用微波技术灭菌, 然后接种脱毒马铃薯苗在培养室中观察。

2 结果与分析

2.1 微波灭菌技术的试验结果

2.1.1 灭菌时间对灭菌效果的影响

灭菌时间对灭菌效果的影响见表 1。当微波功率在 100%、培养基装量在 80 mL·瓶⁻¹ 时, 无论是液体培养基还是固体培养基, 只要灭菌 10 min, 培养 15 d 后仍没有污染, 达到了完全灭菌的效果。其中液体培养基达到完全灭菌效果的时间只需 8 min。这是因为灭菌效果与培养基被微波加热后高温的持续时间有关。

表 1 灭菌时间对灭菌效果的影响

灭菌时间 (min)	微波功率 (%)	培养基装 量(mL)	液体培养基					固体培养基				
			试验数 (瓶)	未污染瓶数				试验数 (瓶)	未污染瓶数			
				3 d	6 d	9 d	15 d		3 d	6 d	9 d	15 d
4	100	80	10	0				10	0			
6	100	80	10	4	3	1	1	10	2	0		
8	100	80	10	10	10	10	10	10	10	8		8
10	100	80	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
12	100	80	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
14	100	80	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

2.1.2 微波功率对灭菌效果的影响

微波功率对灭菌效果的影响见表 2。当培养基装量在 80 mL·瓶⁻¹、灭菌 10 min 时, 无论是液

体培养基还是固体培养基, 微波功率在 80% 以上, 培养 15 d 时所有培养基均未被污染。功率再降低时, 便达不到灭菌效果。

表 2 微波功率对灭菌效果的影响

微波功率 (%)	培养基装 量(mL)	液体培养基					固体培养基					
		试验数 (瓶)	未污染瓶数				试验数 (瓶)	未污染瓶数				
			3 d	6 d	9 d	15 d		3 d	6 d	9 d	15 d	
100	80	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
80	80	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
60	80	10	10	6	0	10	9	6	0			
40	80	10	10	0		10	0					

2.1.3 培养基装量对灭菌效果的影响

培养基装量对灭菌效果的影响见表 3。当微波功率在 80% 瓶、灭菌 10 min 时, 无论是液体培养基

还是固体培养基, 培养基装在 80 mL·瓶⁻¹ 以下时, 培养 15 d 时所有培养基均未被污染。培养基装量再增加时, 便达不到灭菌效果。

表3 培养基装量对灭菌效果的影响

培养基装量 (mL)	微波功率 (%)	液体培养基						固体培养基			
		试验数 (瓶)	未污染瓶数				试验数 (瓶)	未污染瓶数			
			3 d	6 d	9 d	15 d		3 d	6 d	9 d	15 d
60	80	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
80	80	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
100	80	10	10	8	8	8	10	7	2	0	
120	80	10	2	0			10	0			

2.2 液体培养的试验结果

在传统的组织培养中, 培养基加入琼脂的主要作用之一是支撑被培养的组织或器官不被培养液浸润而死, 用液体培养基代替固体培养基就必须解决培养组织的支撑问题。

在本试验中设计了4个处理, 分别是塑料膜(常见的薄膜上打孔)、海棉(0.6 mm厚), 塑料膜

加支架(细铁丝做成)和海棉加支架, 培养基装量为 $80 \text{ mL} \cdot \text{瓶}^{-1}$, 每瓶接种5个单节脱毒马铃薯苗, 观察脱毒苗的成活率, 结果见表4。

表4显示, 用海棉作苗支撑物时, 苗的成活率最高, 达到96%, 海棉加支架处理的成活率次之, 为42%, 塑料膜加支架的成活率为28%, 单用塑料膜时成活率只有16%。

表4 不同处理方法对脱毒马铃薯苗的成活率的影响

处理方法	试验苗数 (株)	观察天数					成活率 (%)
		3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	
塑料膜	50	32	14	8	8	8	16
海棉	50	50	48	48	48	48	96
塑料膜加支架	50	38	26	14	14	14	28
海棉加支架	50	50	50	39	31	21	42

分析其原因, 单用海棉时, 起到了三个作用, 一是海棉吸附培养液, 苗附着在海棉上能吸收到培养液; 二是海棉较培养液的比重轻的多, 接种苗后仍然浮在培养液面上, 苗能露在空气中吸到氧气; 三是当培养液随着培养时间的延长被蒸发时, 海棉能随培养液面的下降而下降, 在整个培养基间海棉都是被培养液浸润的。

单用塑料膜时, 在没有接种苗时, 膜能浮在培养液面上, 一旦接种苗后, 因苗的重力大于培养液的浮力, 苗随膜一起沉没在培养液中, 除少数生命力强的苗能成活外, 多数苗死亡。

用铁丝做成支架, 上面再放海棉或塑料膜处理, 苗成活率居中。海棉加支架, 前期成活率高, 后期死亡率增加, 是因为培养液蒸发, 液面下降时, 因支架的存在, 海棉无法下降, 使苗因吸不到培养液干涸而死。

在支架上放塑料膜处理, 苗的成活率较单用塑料膜时成活率提高了, 这是因为部分接入的苗

被支撑在液面上, 起到与海棉相同的作用, 而后期死亡率的增加, 又与支架有关。

3 结论

在组织培养中, 用家用微波炉可代替高压蒸汽灭菌。用频率为 2450 MHz 、功率为 1200 W 的微波炉, 在 300 mL 的培养瓶装入 $80 \text{ mL} \cdot \text{瓶}^{-1}$ 的培养液, 无论固体培养基还是液体培养基, 在80%以上的功率, 灭菌10 min, 便可实现很好的灭菌效果。在液体培养基中用海棉作脱毒马铃薯苗切段的支撑物可起到固体培养基的作用, 苗的成活率可达到96%。

[参 考 文 献]

- [1] 程家胜. 植物组织培养与工厂化育苗技术 [M]. 北京: 金盾出版社, 2003.
- [2] 胡晓军. 脱毒马铃薯组织培养容器改进研究 [J]. 中国马铃薯, 2004, 18(4): 223-224.