

植物组织培养 实验手册

植物细胞工程实验室

丰 锋

广东海洋大学

2019.3

实验注意事项

- 1.实验前认真预习实验指导及课本相关内容。
- 2.进入实验室请按学号换拖鞋，实验完毕把拖鞋及鞋柜清洁干净，并把拖鞋放入鞋柜中。
- 3.实验开始前，请注意听指导老师讲解实验注意事项。
- 4.实验过程中禁止高声喧哗，高压灭菌时密切注意压力变化，保持压力过程中严格遵守灭菌时间；无菌操作过程禁止随意走动，严禁开启紫外灯！否则会灼伤眼睛；在无菌操作过程中，如果盛放接种刀和镊子的酒精瓶着火，取出接种刀和镊子后，用瓶盖盖住隔绝氧气即可，若不慎碰倒酒精灯，尽快用灭火器灭火。
- 5.实验完毕，把所有物品放回原位，同时各自清洁整理桌面。清洁卫生同学先清洁整理所有物品物归原位，再清洁地面。
- 6.组培室培养材料可以观看，但必须放回原位，禁止带出组培室。

目录

实验 1 组织培养室的建设规划.....	4
实验 2 培养基母液的配制.....	7
实验 3 MS 培养基的配制与灭菌.....	11
实验 4 外植体的消毒及其愈伤组织的诱导.....	14
实验 5 愈伤组织的器官分化.....	17
实验 6 植物茎尖快速繁殖.....	19
实验 7 植物离体培养中的形态观察.....	22
实验 8 再生植株的移植.....	24

实验 1 组织培养室的建设规划

植物组织培养是在严格的无菌条件下培养植物材料，要达到无菌离体培养就需要一定的设备、器材和用具，同时还要人工控制温度、光照等培养条件。而这些工作的完成是在特定的实验室里进行的。下面讲到的实验室也并非全部都具备才能进行工作，这要根据具体任务和当地条件而定。

1.目的

掌握组培实验室和小型工厂的设计方法。

2.原理

2.1 组培实验室的组成

2.1.1.化学实验室

贮备组织培养所用药品和配制培养基的场所。实验室应具备实验台、药品柜、用具柜等基本设施；应备有盛培养基的试管、三角瓶、果酱瓶等容器；加样、贮液、定容所用用具和容器；还应有蒸馏水器，冰箱等。

2.1.2.无菌接种室

无菌接种室是进行植物材料的消毒、分切、接种和培养材料转移的操作场所。

无菌室应达到如下要求：

- a. 室内密闭，安装移动门，使空气不致流动，面积一般 $5\sim 6\text{ m}^2$ 即可；
- b. 墙地光滑平整、便于清洁工作；
- c. 安装紫外灯，以便灭菌；
- d. 室内有光滑平整的操作台；
- e. 无菌室外应设置准备室，作为缓冲间，以避免进出时带进杂菌。

f. 也可用超净工作台代替无菌室，即可在清洁卫生的专用室内安放超净工作台，因超净工作台内的空气是经过过滤除菌的，所以台内小环境是无菌的。

2.1.3.培养室

培养室是将接种到容器中的材料进行培养生长的场所。

培养室应达到如下要求：

a. 培养室空间不宜过大，一般面积 10~12 m²、内空高度 2.3~2.5 m 为宜，室顶和周围墙壁要求有隔热、防火的性能。

b. 应具备培养架，木制和铝合金框架安装玻璃板均可，但木制架应刷防火涂料。架高一般 1.7~2 m，架宽 35~40 cm，架长根据培养室的大小和工作者的需要定。一个培养架可做成几层，一般每层间隔 35~40 cm 即可。在培养架上安装日光灯，一般每层 60~80 w。

c. 培养室应保持在 20~27℃ 左右，可用空调，电炉（接上控温仪）、石英管加热器等设备来解决。

d. 应有控制光照时间的设施，一般可采用安装时间继电器或定时开关钟来自自动控制照明时间。

e. 培养室应保持整洁，切忌堆放无关物品。根据需要还可放置摇床等各种培养装置。

2.1.4. 灭菌室

灭菌室是对无菌操作之用的玻璃器皿，接种用具、无菌滤纸、无菌水和培养基进行灭菌消毒的场所。

玻璃器皿和接种用具可采用干热灭菌法，即在烘箱内 150℃ 约保持 1 h。培养基、无菌水和无菌滤纸则一般采用高压灭菌法，即在高压消毒锅内 121℃，保持 20 min 便可达到灭菌的目的。

2.1.5. 仪器室

仪器室要有固定平整、光滑的水磨石台板，放置天平、离心机、分光光度计、生物显微镜、解剖镜和倒置显微镜等显微观察所必需的仪器。

2.1.6. 暗室

暗室是洗、印观察培养物所拍照片的场所。

要求暗室内有一套冲洗、印相、放大等设备，以便及时见到结果。暗室内需有放大机、晒箱、上光机等设备，有固定的水泥工作台板，还要有电源和自来水装置。

2.2 组培实验室设计原则

必须满足能进行无菌操作和无菌培养，首先是要有一定的无菌环境（无菌室，无菌箱，超净工作台）。使用无菌的容器和用具，进行无菌操作。然后把被培养的植物材料，放在一定的温度，光照，RH，营养条件下，使其生长，发育，繁殖，这就必须有一定设备和条件。

2.3 商业性实验室和小型工厂的设计要点

首先要有套房或厂房，应选择比较干净，安静的地方，房间要合理安排，作到工作方便、减少污染、节省能源、使用安全。

设计组培室时应注意下面几点。

a.为减少污染，组培室最好设走道，人从外面进入，先通过一缓冲走道，再进入。

b.培养室应建在房屋南面，南，东或西应有大窗尽量利用自然光。

c.培养室房间宜小，门也宜小，最好为滑门，以保温节能；接种室房间也宜小，备有准备小间，以更换衣帽等，超净台较宽，门应稍大，双扇滑门，内装紫外线灯。

3.作业

把自己居住的房子改造成一个小型组培实验室。要求画出原房子及改造后的实验室平面图，并标出各房间功能。

实验 2 培养基母液的配制

1.目的

掌握培养基母液的配制方法。

2.原理

配制培养基时，为了使用方便和用量准确，通常采用母液法进行配制，即将所选培养基配方中各试剂的用量，扩大若干倍后再准确称量，分别先配制成一系列的母液置于冰箱中保存，使用时按比例吸取母液进行稀释配制即可。以 MS 培养基为例，所需配制的母液可分为：MS 大量元素母液、MS 微量元素母液、MS 铁盐母液和 MS 有机化合物母液等。另外，还要配制生长物质母液，在不同类型的培养基中使用。

3.实验器具与药品

电子分析天平、托盘天平、烧杯（50 ml，100 ml，500 ml ,1 000 ml）、量筒（1 000 ml，100 ml，25 ml）、容量瓶（1 000 ml ,500 ml，100 ml），磨口试剂瓶(500 ml，1 000 ml)、药勺、称量纸、玻璃棒、滴管、电炉、冰箱。

MS 培养基所需药品准备，植物生长调节物质 2, 4 - D，NAA，6 - BA 等

4.培养基母液的配制过程

以 MS（1962）基本培养基为例，根据各种药品的特点，可按下述方法配制：

首先，按 MS 培养基母液的配制，将各种母液根据各自的扩大倍数，计算出扩大后的称取量，然后，分别进行药品称取和母液配制。具体操作如下：

4.1 MS 大量元素母液的配制

按照 MS 培养基配方的用量及相应的扩大倍数。配制时先用量筒量取蒸馏水大约 400 ml，放入 500 ml 的烧杯中，依次分别称取： NH_4NO_3 、 KNO_3 、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，按顺序先后倒入烧杯中，用玻璃棒搅动，待第一种化合物溶解后再加入第二种化合物，当最后一种化合物完全溶解后，将溶液倒入 500 ml 的容量瓶中，用蒸馏水定容至 500 ml，然后，倒入细口磨砂试剂瓶中，贴上标签，注明药品及重量、定容体积、扩大倍数、配制日期、配制人姓名，置于 4℃ 冰箱保存

备用。

也可把大量元素母液按下表母液编号（1、2、3）分开配制，**注意按编号药品单独称量，分别溶解，再混合定容。其中 KH_2PO_4 可加热溶解。**

母液编号	药品名称	规定量 mg/L	称量 (g)	扩大倍数	定容量 (ml)	吸取量 (ml/L)
1	KNO_3	1900	19.0	10	500	50
	NH_4NO_3	1650	16.5			
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	3.7			
2	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	4.4	10	500	50
3	KH_2PO_4	170	1.7	10	500	50
4	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	37.3	3.73	100	500	5
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	2.78			
5	H_3BO_3	6.2	6.2	1000	1000	1
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	8.6			
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	22.3			
	$\text{Na}_2\text{M}_0\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25			
	$\text{CoCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025			
	KI	0.83	0.83			
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025			
7	肌醇	100	10	100	1000	10
6	烟酸	0.5	0.5	1000	1000	1
	$\text{V}_{\text{B}1}$	0.1	0.1			
	$\text{V}_{\text{B}6}$	0.5	0.5			
	甘氨酸	2.0	2			

4.2 MS 微量元素母液的配制

将 MS 培养基配方中微量元素的无机盐用量分别扩大 1 000 倍，用电子分析天平分别依次称取药品，并用重蒸水逐个溶解，待全部溶解、用容量瓶定容后，装入 1000 ml 的磨口试剂瓶中，贴上标签，注明配制日期、扩大倍数、配制人姓名，置于 4 ℃ 冰箱保存备用。

也可把微量元素母液分成 3 组，分别为：① $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ；② $\text{Na}_2\text{M}_0\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CoCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、KI；③ H_3BO_3 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 。其中①、②可扩大到 5000

倍配制，③号扩大到 1000 倍配制，分别定容为 1000 ml。再吸取①、②号母液各 20 ml、③号母液 100 ml 混合定容为 1000 ml，配制成 100 倍母液使用。

4.3 铁盐母液的配制

在电子天平上准确称取 2.78 g 硫酸亚铁和 3.73 g 乙二胺四乙酸二钠，分别倒入盛 150~200 ml 蒸馏水的烧杯中，微加热乙二胺四乙酸二钠并不断搅拌使之全部溶解。将硫酸亚铁溶液缓慢倒入乙二胺四乙酸二钠溶液中，边倒边搅拌，混合均匀后，用蒸馏水定容至 500 ml，并倒入棕色磨口试剂瓶中，经室温放置一段时间令其充分反应后，贴上标签，注明配制日期、扩大倍数、配制人姓名，置于 4℃冰箱保存备用。如果将新配制的铁盐母液立即放入冰箱中，则会容易形成沉淀。

4.4 MS 有机母液的配制

用电子天平依次称取：肌醇、盐酸硫胺素、烟酸、甘氨酸、盐酸吡哆醇，用蒸馏水依次分别溶解并定容后，装入 1000 ml 的磨口试剂瓶中，贴上标签，注明配制日期、扩大倍数、配制人姓名，置于 4℃冰箱保存备用。

4.5 植物生长物质母液的配制

由于水剂型的植物生长物质在组织培养中，既使用方便，又消毒简单，故在配制培养基前常将常用的植物生长调节物质，如 2, 4-D, 6-BA 和 NAA 等配制成 0.5-1.0 mg/ml 浓度的母液。其配制方法如下：

①2, 4-D 母液：准确称量 2, 4-D 500 mg，先用 1-3 ml 90%乙醇完全溶解后，加蒸馏水定容；也可以加入少量碱（如 1 mol/L 氢氧化钾、氢氧化钠）溶液，使之中和成为钠盐或钾盐，在水中溶解，再加水定容至 1000 ml，即配成浓度为 0.5 mg/ml 的母液。贴上标签，注明名称、浓度和配制日期，冰箱保存。NAA 母液的配制过程与 2, 4-D 相同。

②6-BA 母液：准确称量 1000 mg 6-BA，加入少量碱溶液（如 1 mol/L 氢氧化钾、氢氧化钠）或稀盐酸（1 mol/L 盐酸）溶液使之完全溶解后。加蒸馏水定容到 1000 ml，即配成浓度为 1.0 mg/ml 的 6-BA 母液，转入磨口试剂瓶中，贴上标签，注明母液名称、

浓度和配制日期，放 4℃冰箱保存待用。

5. 注意事项

在配制大量元素母液时，混合、溶解各种无机盐时要注意先后顺序，尽量把 Ca^{2+} ， SO_4^{2-} 和 PO_4^{3-} 等离子错开分别溶解，同时稀释度要大一些，并要慢慢地边混合边搅拌。

6. 实验报告

根据表中各母液或药品的浓度，计算配制不同体积的 MS 十 2,4-D 1 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L 培养基所需吸取的母液或所称取的药品量，并将结果填入下表：

药品名称	MS 配方用量	母液扩大倍数或浓度	定容体积 (ml)	配制 1 L 培养基吸取母液量/ml	配制 0.5 L 培养基吸取母液量/ml	配制 0.2 L 培养基吸取母液量/ml
大量元素	—	10×	1000			
微量元素	—	100×	1000			
铁盐母液	—	100×	1000			
有机母液	—	100×	1000			
2,4-D	1 mg/l	0.5 mg/l	1000			
6 - BA	0.5 mg/l	1.0 mg/l	1000			
蔗糖	30	—	—			
琼脂	4.5	—	—			

实验3 MS培养基的配制与灭菌

1.实验目的

学习用母液法配制MS培养基以及掌握培养基灭菌的方法及操作过程。

2.原理

组织培养所用的培养基含有植物生长所必需的各类营养物质，同时也是各种细菌、真菌滋生繁殖的极好场所、因此必需对培养基等进行灭菌处理，以确保无菌操作的顺利进行。

3.实验用具和药品

电子天平、托盘天平、烧杯（50 ml，100 ml，500 ml，1 000 ml）、量筒（1000 ml，500 ml，25 ml），药勺、称量纸、玻璃棒、移液管（10 ml，5 ml，2 ml，1 ml，0.5 ml，0.2 ml）或移液枪（1 ml、5 ml、0.2 ml等）、电炉（或电磁炉）、石棉网、吸耳球、pH试纸（5.0-7.0）、三角瓶（50 ml，100 ml）或果酱瓶、耐高温高压的专用封口膜、冰箱、高压灭菌锅、蔗糖、琼脂、1 N HCl, 1 N NaOH; 2, 4-D 母液及MS基本培养基各母液。

4.实验步骤

4.1 培养基的配制

每组配培养基 1000 ml，培养基组成为：

MS+ 2，4-D 1.0 mg/L+3%蔗糖+0.45%琼脂（pH 5.8）。

① 首先，将所需的各贮存母液按顺序排好，将洁净的各种玻璃器皿，量筒、烧杯、移液管、玻璃棒、漏斗等放在指定的位置；准备好蒸馏水及瓶盖、专用封口塑料薄膜等。然后，根据所需配制的培养基用量，按照下面的公式及所需的各种母液的扩大倍数，分别计算需吸取各母液的数量（ml数）

$$\text{吸取量} = \text{需要配制培养基的体积} \times \frac{\text{需要配制浓度}}{\text{母液浓度}}$$

本实验需配制 1000 ml 添加 1 mg/L 2, 4-D 的 MS 培养基，所需吸取的各种母液

的用量如表 1 所示。

表 1 配制 1000 ml MS+2, 4-D 1.0 mg/L 培养基的母液用量

母液编号	母液浓度 / (mg/L)	扩大倍 数	定容体积 (ml)	1000 毫升培养基吸取 量/ml
1 [#]	—	10×	500	50
2 [#] (钙)	—	10×	500	50
3 [#] (钾)	—	10×	500	50
4 [#] (铁盐)	—	100×	500	5
5 [#] (微量)	—	100×	1000	10
6 [#] (有机)	—	100×	1000	10
7 [#] (肌醇)	—	100×	1000	10
2, 4-D	0.5	—	—	2

②取 250~500 ml 烧杯一个，用量筒取大量元素母液，用各母液专用移液管分别吸取微量元素母液、有机母液、铁盐母液和 2, 4-D 母液置于烧杯中备用（注意：各母液移液管不能混用）。

③取 1000 ml 烧杯或不锈钢锅一个，先用量筒量取培养基计划配制量 2/3 左右体积水（可以是自来水）倒入烧杯或不锈钢锅中，准确称取琼脂 4.5 g、蔗糖 30 g 加入烧杯或不锈钢锅中置于电炉上或电磁炉上煮沸，待琼脂完全溶化后，将准备好的含大量元素、微量元素、铁盐、有机物和激素的母液混合液倒入其中，用蒸馏水或自来水将装过母液混合液的烧杯洗三遍，一并倒入烧杯或不锈钢锅中，加水定容至设定的体积。

④用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 将培养基的 pH 值调至 5.8-6.0，用酸、碱调节 pH 值时，应用玻璃棒不断搅拌后，再用 pH 试纸或 pH 计测试。

⑤将培养基分装入 250 ml 果酱瓶中，每瓶约装 30~35 ml 培养基。分装培养基时，切勿将培养基倒在瓶口或瓶外壁上。培养基分装完后，应随即用专用的耐高温高压的

封口塑料薄膜、铝箔或瓶盖封好瓶口，准备灭菌。

4.2 培养基的灭菌

可用于培养基灭菌的器具有多种类型，如手提式消毒灭菌锅、立式灭菌锅等进行灭菌。其操作步骤如下：

① 高压灭菌容器先加入适量的水，以水位与锅内三角搁架相平行为宜，注意加水量不可过少，**以防灭菌锅干烧，烧坏发热管**。把分装好的培养基及其他需灭菌的各种用具（如用牛皮纸包扎好的剪刀、镊子、解剖刀，培养皿）和蒸馏水等，放入消毒灭菌锅的消毒桶内，然后盖上锅盖（若为手提式消毒灭菌锅需将盖上的排气软管插入消毒桶壁的排气槽内）后，上好螺丝，对称逐个拧紧后，接通电源加热。

② 当灭菌锅盖上的压力表指针移至 0.05~0.07 MPa 时，打开放气阀门排除锅内冷空气，待压力表指针回复到零位后，关闭放气阀门继续加热。当灭菌锅的压力表指针移至 0.11 MPa (121.5℃) 时，通过调节放气阀，控制热源，使压力表保持在该压力 15~20 min，即可达到灭菌目的。

③ 灭菌所需时间到后，应先切断电源，让灭菌锅内温度自然下降；待灭菌锅压力表的压力降低至 0 时，才能打开排气阀，旋松螺栓，开启锅盖，取出已灭菌的培养基。

④ 刚灭过菌的培养基应在室温下放置 2~3 天后，观察有无菌类生长，以确定培养基是否彻底灭菌。经检查没有杂菌生长污染，方可使用。

5. 注意事项

① 灭菌锅内冷空气必需排尽，否则，压力表指针虽达到了一定压力，但由于锅内冷空气的存在并达不到对应的温度，从而影响灭菌效果。

② 在灭菌过程中，当压力达到时，要严格控制时间，时间太长会使培养基中的一些化学物质遭到破坏，影响培养基的成分；而时间太短则达不到灭菌效果。

实验 4 外植体的消毒及其愈伤组织的诱导

1. 目的

通过实验，初步掌握外植体植物材料消毒、接种的无菌操作技术以及外植体愈伤组织诱导的方法。

2. 原理

植物组织培养是应用无菌操作的方法培养离体的植物器官或组织，甚至单个细胞的过程。如果组织培养使用的植物材料是带菌的，在接种前就必须选择合适的消毒剂对植物外植体进行表面消毒，获得无菌材料去进行组织培养，这是取得组织培养成功的最基本的前提和重要保证。由于植物细胞具有全能性，外植体在合适的培养基上，通过脱分化，形成一种能迅速增殖的无特定结构和功能的细胞团—愈伤组织。而植物生长调节剂如 2, 4-D 等是诱导外植体形成愈伤组织的重要影响因素。

3. 材料、试剂及器具

3.1 材料

新鲜的胡萝卜块根或甘蔗叶片。

3.2 试剂及培养基

0.1% HgCl_2 （剧毒！小心使用）、75%乙醇、无菌水及 2%新洁尔灭等。

胡萝卜块根愈伤组织诱导的培养基：MS +2, 4-D 1~2 mg/L+30 g/L 蔗糖+4.5 g/L 琼脂(pH 5.8)；或 MS +IAA 10 mg/L+KT 0.1 mg/L +30 g/L 蔗糖+4.5 g/L 琼脂(pH 5.8)

3.3 器具

无菌吸水纸、一次性手套、标签纸、记号笔、超净工作台、酒精灯、烧杯、镊子、剪刀、解剖刀等。

4. 操作步骤

4.1 接种前，用 75%酒精或用 2%新洁尔灭溶液擦拭超净工作台台面，将培养基及接种用具放入超净工作台台面，打开超净工作台紫外灯，照射约 20~30 min，然后开送

风开关，之后关闭紫外灯，通风 10 min 后，再开日光灯即可进行外植体的消毒和接种等无菌操作。

4.2 将健壮的胡萝卜块根在自来水下冲洗干净，用小刀切去外围组织（1~2 mm），将肉质根横向切成约 10 mm 厚的切片，置于 200 ml 烧杯中（**后续步骤操作均需**在无菌条件下进行）。将胡萝卜切片转入无菌烧杯（或无菌瓶）中，用 75% 酒精溶液浸泡 30 秒后，移入添加 1~2 滴吐温-20 (Tween - 20) 的 0.1% 氯化汞溶液灭菌 5~15 min（或 2% 次氯酸钠 10 min），用无菌水洗涤 4 次，无菌纸吸干水分后，置于经灭菌处理过的培养皿中。使用镊子和解剖刀时，应先在酒精灯火焰上灼烧片刻，冷却后，再将胡萝卜髓部组织（含形成层）切成约 1~2 mm 厚、直径 5 mm 的小块，以上操作都要求在酒精灯火焰旁进行。

4.3 用无菌的镊子，将胡萝卜髓部组织小块接种至盛胡萝卜块根愈伤组织诱导培养基的培养瓶中，每瓶接种 3~4 块，接种完毕，把材料置于培养室内暗培养（每一个同学有固定培养架位），同时在实验记录表上注明接种日期、材料名称、接种数量（瓶）、培养基名称等。

4.4 实验完毕整理、清洁超净工作台台面、清洗容器。

4.5 经常观察胡萝卜块根外植体的生长变化或污染情况，并在培养一段时间后统计外植体的污染率以及其愈伤组织的诱导率。

一般接种 10 d 左右，外植体表面变得粗糙而有光泽，表明已开始形成愈伤组织。具体时间取决于培养物的生长速度，在培养 3~4 周后，可以把愈伤组织切成小块，转移到成分相同的新鲜培养基上继代。继代时只能选用生长旺盛的健康组织，由局部坏死造成的褐化组织应予淘汰。继代可以反复进行。随着继代次数的增加，愈伤组织的数量可以不断扩大。

5. 实验报告

5.1 观察胡萝卜块根切片外植体接种后 2-6 天左右的污染情况，并统计被污染的块根外植体数，计算出污染率及确定合理的外植体灭菌时间。

$$\text{污染率}(\%) = \frac{\text{污染的材料数}}{\text{接种材料总数}} \times 100$$

如果培养材料大部分发生污染，说明消毒剂浸泡的时间过短；若接种材料虽然没有污染，但材料已发黄，组织变软，表明消毒时间可能过长，组织被破坏死亡；接种材料若没有出现污染，生长正常，则表明此时为该消毒剂的最适宜消毒时间。

5.2 观察并逐日记录胡萝卜切块产生愈伤组织的情况，包括出现愈伤组织前外植体的形态变化，愈伤组织出现的时间以及愈伤组织的形态特征（包括愈伤组织的颜色、质地和色泽等）；并依下面的方式计算外植体的愈伤组织诱导率。

$$\text{诱导率}(\%) = \frac{\text{形成愈伤组织的材料数}}{\text{总接种材料数}} \times 100$$

6. 思考题

6.1 为什么常在消毒溶液中加入 1—2 滴表面活性剂（如吐温）？为什么外植体用消毒剂消毒后，要用无菌水洗涤干净？

6.2 在接种过程中，通过哪些措施来防止杂菌对接种工具、接种材料的污染？

附录 植物组织无菌操作的一般步骤

①.将植物组织块置于一个有螺丝盖的玻璃瓶中，注入含有几滴活化剂的浓度适当的消毒液（0.1~0.2%升汞、次氯酸钠等），使材料完全浸没在消毒液中，盖上盖，把玻璃瓶置入超净工作台上。在消毒期间须把玻璃瓶摇动 2~3 次。

②.消毒处理后，将瓶盖打开，将消毒液倒出，注入适量的无菌蒸馏水，再盖上盖，摇动数次，将水倒掉，如此重复 3~4 次。

③.将材料取出，置于一个已经灭过菌的培养皿中。

④.在对植物材料进行消毒处理的同时，对所要使用的器械进行消毒，方法是把它们蘸入 95%酒精中，取出后再置酒精灯火焰上灼烧，待冷却后即可使用。所有操作器械往往需要在每次使用前消毒一次。

⑤.使用这些消过毒的器械（如解剖刀、解剖针、打孔器、剪刀、体视显微镜等）由已经过表面消毒的材料切取适当的外植体。

⑥.将培养容器的盖或塞子打开，将外植体接种到培养基上，如果使用的是玻璃培养容器，把瓶口置酒精灯火焰上烘烤数秒钟，然后迅速用瓶盖或瓶塞封严。

实验 5 愈伤组织的器官分化

1. 目的

通过实验，掌握运用植物生长调节物质调控植物愈伤组织分化的方法。

2. 原理

离体的植物组织在一定的条件下，可发生“脱分化”，即已经分化了的植物细胞重新分裂生长，形成均一的无组织结构的细胞团，即愈伤组织。这种愈伤组织在一定条件下，又能“再分化”出根和芽等器官。在这些过程中，植物生长调节物质起着决定作用，调控着愈伤组织的芽或根的分化。

3. 实验材料、试剂及器具

3.1 材料

实验 4 获得的胡萝卜块根愈伤组织。

3.2 试剂

NAA、6-BA、琼脂、蔗糖等。

3.3 培养基

胡萝卜愈伤组织芽分化培养基：①MS + NAA 0.1 mg/L + 6-BA 1 mg/L ②MS + 6-BA 1.0 。胡萝卜愈伤组织根分化培养基：①MS + NAA 0.5 mg/L 以上 MS 培养基均添加蔗糖 30 g/L，琼脂 4.5 g/L (pH 5.8)。

3.4 器具

镊子、解剖刀、无菌纸、灭菌过的培养皿、超净工作台、酒精灯等。

4. 实验步骤

4.1 愈伤组织芽或根分化培养基的配制

首先按实验 3 的方法，制备下列供胡萝卜块根愈伤组织芽分化的培养基：MS + NAA 0.1 mg/L + 6-BA 1 mg/L；MS + 6-BA 1.0 mg/L；胡萝卜愈伤组织根分化培养基：MS + NAA 0.5 mg/L。

4.2 在超净工作台上，将实验 4 所获得的胡萝卜块根愈伤组织，分别转接入愈伤组织

芽分化培养基和根分化培养基中，并置于 26℃、在 2 000 lx,每天 14 h 光照下培养，并逐日观察记录胡萝卜块根愈伤组织的形态变化，并在 3-4 周后统计愈伤组织的幼芽或幼根的分化率。

5. 实验报告

5.1 观察并记录胡萝卜肉质块根愈伤组织在芽分化培养基上培养 3~4 周后的生长和幼芽分化状况，并依下式计算愈伤组织的幼芽分化率。

$$\text{幼芽分化率 (\%)} = \frac{\text{生芽的愈伤组织块数}}{\text{接种愈伤组织总块数}} \times 100$$

5.2 观察并记录胡萝卜块根愈伤组织在其根分化培养基上培养 10~15 天后的不定根发生情况，并依下式计算其生根率 (%)：

$$\text{生根率 (\%)} = \frac{\text{生根愈伤组织块数}}{\text{接种愈伤组织总块数}} \times 100$$

6. 思考题

植物愈伤组织的芽和根的分化与植物生长调节物质有何关系？

实验 6 植物茎尖快速繁殖

1. 实验目的

通过香石竹或菠萝蜜、草莓等茎尖培养，掌握植物茎尖快速繁殖的基本方法和过程。

2. 实验原理

植物离体快繁又叫微型繁殖（micropropagation），就是把植物材料（茎尖，腋芽或侧芽、叶片等）放在培养容器内，给予人工培养基和合适的无菌培养条件，达到短时间内高速增殖植株的无性生殖技术。

3. 材料、试剂及器具

3.1 材料

香石竹或菠萝蜜、草莓茎尖或腋芽。

3.2 试剂

NAA、BA、琼脂、蔗糖等。

3.3 香石竹茎尖快繁的培养基

①MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L；②MS+NAA 0.02 mg/L+6-BA 2.0 mg/L；③MS+BA 2 mg/L；④MS+BA 2 mg/L+NAA 2 mg/L。以上培养基均添加蔗糖 30 g/L，琼脂 4.5 g/L，pH 5.8。

3.4 实验设备和用具

镊子、剪刀、无菌纸等接种用品、超净工作台、双筒解剖镜、酒精灯等。

4. 实验步骤

4.1 茎尖快繁培养基的配制

首先按实验 3 的方法，分组制备下列供茎尖快速繁殖用的培养基：①MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L；②MS+NAA 0.02 mg/L+6-BA 2.0 mg/L；③MS+BA 2 mg/L；④MS+BA 2 mg/L+NAA 2 mg/L。

4.2 香石竹茎尖的消毒和接种

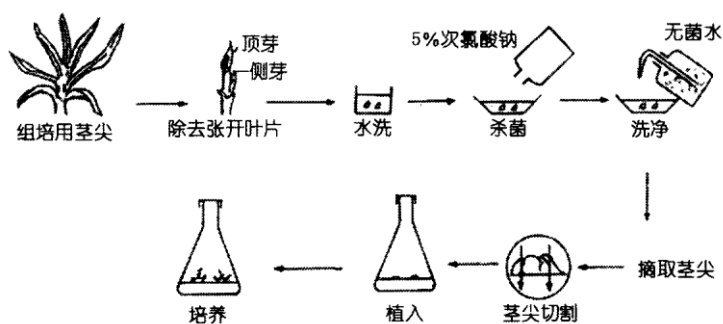


图 7-1 香石竹茎尖培养的流程

首先，选取生长健壮的香石竹茎尖或幼嫩的侧芽，除出张开的叶片，用清水冲洗干净，用纱布吸干水份后，置于 5% 的次氯酸钠溶液（也可用 0.1% 升汞溶液）中消毒 6~10 min，无菌水冲洗 5~6 次后，在超净工作台上，在 25 倍或 50 倍的双筒解剖镜下用解剖刀轻轻除去外层嫩叶，切取 0.2~0.3mm 的茎尖，接种至已灭菌的香石竹茎尖快繁培养基上，在温度为 25℃，光照强度为 1 000—1 600 lx，每天 12~14 h 光照条件下培养。

4.3 茎尖的培养和快速繁殖

待培养 1 周后，香石竹茎尖转绿产生新叶，约 3~4 周后开始大量长芽，约 1 个月左右可长满一瓶大小不同的试管苗。将这些无根试管苗的茎尖切下，分组继代转接于与前一次相同的香石竹茎尖快繁的培养基上，置于同样的培养条件下进行继代增殖培养。大约每 3 周左右就会增殖一次。在实验过程中，准确记录每次起始接种时的茎尖数目，每次继代转接前所产生的茎尖总数目。重复继代培养 2~3 次后，计算香石竹茎尖的增殖率。

5. 实验报告

5.1 观察并详细记录茎尖在不同培养基上的生长情况，其指标包括产生芽的数目和形态；并统计茎尖在不同培养基上的繁殖系数。

5.2 根据实验结果，分析植物生长物质的种类和浓度以及其配比在香石竹茎尖快繁中的作用特点。

6. 思考题

为什么用香石竹茎尖快繁培养时，常需采用大小为 0.2~0.3 mm 的茎尖进行快繁培育？

附：非洲紫罗兰叶片的离体培养和器官发生

材料：非洲紫罗兰(*Saintpaulia ionantha*)成年植株。

不定芽诱导培养基：MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/l +蔗糖 3% +琼脂 0.45%，pH5.7。

生根培养基：MS+蔗糖 1.6%+琼脂 0.45%，pH5.7。

方法和步骤：

1. 由非洲紫罗兰成年植株上采集健康叶片，保留叶柄。把叶片在凉肥皂水中涮洗片刻，然后流水冲洗干净。以下各步骤皆须在无菌条件下进行。

2. 把叶片在 70%酒精中浸蘸数秒，然后用无菌蒸馏水洗净，最后再用 0.5%次氯酸钠溶液消毒 10 min，用无菌蒸馏水冲洗 3 次。

3. 将叶片置于皿底铺有滤纸的无菌培养皿中，以吸掉叶片上多余水分。对器官发生来说，最有效的叶片组织处于叶片的中央区域，外缘和叶尖则鲜见器官发生。用镊子和解剖刀将叶片切成 10-12 mm 见方的外植体，注意每个外植体应包含一部分中脉；叶柄则切成 10 mm 一段。将一部分外植体垂直插于培养基中，插入的部分应占外植体的 1/4；另一部分外植体则平置于培养基上，下表面朝下，接触培养基。

4. 接种后置于 25℃下培养，每天光照 16 h，光照强度 1 000-1 500 lx。

5. 培养 2-4 周后开始出现茎芽，它们多与叶片近轴表面内的叶脉断口相连。6-8 周后茎芽大量增殖，这时可以在无菌条件下将苗丛拆分，转移到生根培养基中诱导生根。生根培养基的基本成分与茎芽诱导培养基的相同，但不加任何植物激素，并把蔗糖浓度降到大约 1.6%(W/V)。试管内的生根幼苗经过炼苗后即可栽到无菌土壤中，但也可尝试不经生根培养而将无菌苗直接栽入灭过菌的土壤中，令其在试管外生根。移栽后的最初几天须注意保湿，并避免阳光直射。

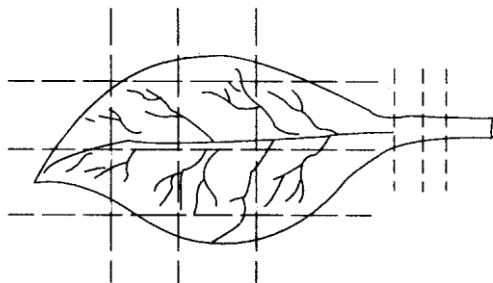


图 7-2 由非洲紫罗兰切取外植体的方法。

由 1 张叶片可以切取 4 片 1 cm 见方的叶片外植体和 2 个 1 cm 长的叶柄切段。

实验 7 植物离体培养中的形态观察

1. 实验目的

识别各种外植体类型在离体培养条件下，形态变化和器官发生的方式。同时学习观察记载的方法。

2. 实验用具

实体解剖镜、手持放大镜、台灯（光源）、计数器

3. 实验材料

由植物不同外植体，经离体培养而形成的不定芽、不定根、愈伤组织、胚状体等。

4. 实验内容

4.1 观察各种外植体的接种状况，如芽、鳞片、花药、组织片、种胚等培养材料。统计材料褐变和污染的百分率。

4.2 识别愈伤组织、胚状体、芽原始体、芽、根的形态。

4.3 观察愈伤组织和胚状体的分化状况，统计它们分化百分率。

4.4 观察根、芽的分化状况，统计它们分化百分率。

5. 作业

将统计结果记入下列表内：

表 1 各种不同培养基中培养材料褐变、污染的检验结果

培养基处理	区组	培养外植体	褐变外植体	污染外植体
		块	块 %	块 %

表 2 不同培养基处理对愈伤组织和胚状体分化的影响

培养基处理	区组	培养外植体	愈伤组织	胚状体	
		块	块 %	个	%

表 3 不同培养基处理对根、芽分化的影响

培养基处理	区组	培养外植体	形成芽的外植体	形成根的外植体		完整小植株	
		块	块 %	块	%	个	%

实验 8 再生植株的移植

试管苗要从培养基中移栽到土壤里，这是一从“异养”到“自养”的转变，这个转变要有个逐渐锻炼和适应的过程。在植物的组织培养中，常常会遇到在培养基中试管苗生长很好，可一量从缸中移出，往往大量死亡。这是由于试管苗一直在高湿度、弱光照和温度温和的环保中生活，而外界湿度低、光照强而且温度变化较大，尤其是冬季和夏季温度很低或很高，所以条件的突然改变（而且有时很剧烈）会招致移植的失败。

1 目的：学习并掌握再生植株的移栽技术。

2 用具和用品

镊子、烧杯、营养钵（营养袋）、膨胀珍珠岩、泥炭、培养盘、聚乙烯薄膜

3 植物材料和营养液

3.1 植物材料采用已诱导生根炼苗的幼小植株。

3.2 营养液

Huagland 营养液

大量元素	g/L	微量元素	g/L
Ca(NO ₃)·4H ₂ O	0.94	H ₃ BO ₃	28
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.52	MnSO ₄ ·H ₂ O	34
KNO ₃	0.66	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.0
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.12	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.2
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0278	(NH ₄) ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1.0
Na ₂ -EDTA	0.0373		

0.1ml 微量元素与 1L 大量元素物相混和, pH 6.7。也可用 1/2MS 大量元素代替。

4. 操作程序及技术

① 准备培养土: 将珍珠岩、椰糠(沙)、菜园土按 2: 2: 6 混匀(可加 10% 左右腐熟有机肥), 装入营养钵(或营养袋), 先装 2/3~3/4 左右, 再用沙装满, 置于培养盘中。

② 浇灌水或 Hoagland 营养液使之湿润即可, 以后一直保持湿润状态。

③ 从培养容器中取出小植株用自来水把根部的琼脂培养基冲洗干净。

④ 栽植到营养钵中。注意专人按大小先分级再移栽。移栽完毕后淋定根水。

⑤ 每植株幼苗用烧杯罩上或用薄膜做成小拱棚盖上, 上覆遮阳网, 移栽 7 d 内早晚各淋水 1 次, 以后可每天淋水 1 次, 同时结合淋水通风。

⑥ 移栽成活(10 天左右)后除去烧杯或薄膜。

⑦ 定植于土质较好疏松的土壤之中。

注意事项: 充分炼苗, 分级移栽, 精心管理。移栽后必须用薄膜覆盖, 保证空气湿度 100%, 逐渐适应外界, 才有较高的移栽成活率。

