

龚一富 主编

植物组织培养



实验指导

Zhiwu Zuzhi Peiyang
Shiyan Zhidao



科学出版社

植物组织培养实验指导

龚一富 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书根据现代植物组织培养技术理论和方法编排了 22 个实验,包括培养基的配制、外植体表面消毒、器官分化、快繁技术、茎尖脱毒技术、微型薯诱导、花药培养、人工种子、细胞培养、原生质体培养及融合、水培技术、非试管快繁技术、遗传转化技术、转基因植株鉴定等内容。本书除植物组织培养基本实验外,还设置了多种植物的快繁技术和水培技术等,供学生实验时选择参考。本书既突出植物组织培养基本实验技能,又增加了训练学生科研创新能力的综合性实验。

本书适合于综合性大学、农林院校、高职院校等生物技术、生物科学、生物工程、农学、园艺、林学等生物相关专业的实验教材,也可供植物组织培养相关研究生、教师和科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

植物组织培养实验指导 / 龚一富主编. —北京:
科学出版社, 2011. 9
ISBN 978 - 7 - 03 - 032213 - 5

I. ①植… II. ①龚… III. ①植物—组织培养—实验
—高等学校—教学参考资料 IV. ①Q943. 1 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 175936 号

责任编辑: 陈 露 叶成杰 / 责任校对: 刘珊珊
责任印制: 刘 学 / 封面设计: 殷 靓

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

江苏省句容市排印厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011 年 9 月第 一 版 开本: B5(720×1000)

2011 年 9 月第一次印刷 印张: 7

印数: 1—2 500

字数: 132 000

定价: 16.00 元

前 言

植物组织培养技术是一门实用性非常强的现代生物技术课程,也是植物基因工程实验的基础和关键技术之一。目前,农业产业化、农业产业结构调整、城市绿化、退耕还林工程等需要大量的持续优质高效的经济植物、花卉园林植物、园艺植物种子种苗,通过植物组织培养技术和植物非试管快繁技术可实现植物的规模化繁殖和种植,将为观赏植物种子种苗工程带来一次全新的育苗革命。水培花卉因其观赏价值而具有很大的市场前景,深受人们喜爱。

植物组织培养技术属于实用性很强的高新技术,也是高等院校生物技术专业、生物科学专业和生物工程专业的必修课程,也是高职类院校的必修实践课程。开设《植物组织培养实验》课程,是生命科学技术发展的需要,也是学生掌握一项真正的实用生物技术的需要,通过该课程的学习和实践,让学生掌握植物组织培养技术、植物非试管快繁技术和植物水培技术的原理和基本操作技能,为学生毕业后从事植物基因工程研究、花卉园林园艺植株快繁及种子种苗工程、观赏创意农业开发推广等方面的研究和管理工作的打下坚实的理论和实践基础,也为学生就业和自主创业提供技术和理论基础。

本书在编写过程中,结合编者多年教学经验以及自身的科学研究经验和成果,并参考大量植物组织培养相关书籍和文献资料,编写了本实验教材。本书共开设22个实验,每个实验都详细介绍了实验目的、实验原理、实验材料器材、实验步骤、注意事项、实验结果和实验报告,并附有思考题。

由于编者水平有限和实践所限,书中难免存在错误和不足之处。希望读者在使用本教材过程中,对我们教材的不当之处,提出您宝贵的意见和批评指正,在此表示感谢。

龚一富

2011年6月

目 录

前言

实验一 玻璃器具等的清洗、烘干、包扎、灭菌	1
实验二 培养基母液的配制	5
实验三 培养基的配制、灭菌及分装	10
实验四 外植体表面消毒和接种	15
实验五 愈伤组织的诱导与增殖	20
实验六 外植体不定芽的分化	24
实验七 常见植物离体快繁技术	26
实验八 茎尖脱毒技术	37
实验九 马铃薯试管微型薯的诱导	44
实验十 成熟胚培养	46
实验十一 花药培养	49
实验十二 人工种子制作	51
实验十三 植物细胞悬浮培养技术	53
实验十四 植物细胞生长和活力的测定	55
实验十五 细胞微室培养技术	60
实验十六 原生质体的分离和培养	62
实验十七 原生质体融合	64
实验十八 植物水培技术	67
实验十九 植物非试管快繁技术	74
实验二十 农杆菌介导的植物遗传转化	77
实验二十一 转基因植株基因组 DNA 的提取	84
实验二十二 转基因植株 PCR 鉴定	90

附录一	植物组织培养常用培养基配方	93
附录二	常见水培营养液配方	98
附录三	常见植物激素单位换算	102
附录四	常见植物激素的配制和贮存	103
附录五	常见抗生素的配制和贮存	104
主要参考文献		105

实验一 玻璃器具等的清洗、烘干、包扎、灭菌

【实验目的】

学习掌握玻璃器具等器材的清洗、烘干、包扎和灭菌技术。

【实验原理】

在植物组织培养实验中,需要将实验所用的玻璃器具清洗干净,植物离体细胞组织培养对任何玻璃器皿残留的毒性物质都十分敏感,可能会影响植物细胞的生长和分化。毒性物质包括解体的微生物、细胞残余物以及非营养的化学物质。某些化学物质仅 $0.01\text{ }\mu\text{g/L}$ 就会对细胞产生毒性作用,因此,植物组织培养实验中对培养器皿的清洗是一项极为重要的环节,对培养器皿清洗和消毒是否彻底,会直接影响植物组织培养的实验结果,甚至导致实验失败。因此,在开展植物组织培养实验之前,需要掌握玻璃器皿的清洗、消毒的基本原理和技能。

严格的消毒灭菌对植物组织细胞培养的成功率也极为重要。植物组织培养中常采用物理灭菌法和化学消毒法两种消毒方法。高温高压蒸汽灭菌法适合于玻璃器皿的消毒。植物组织培养中接种用的玻璃器皿需要处于无菌状态,通常采用高温高压灭菌方法可达到无菌的目的。

【材料、仪器与试剂】

1. 材料

洗涤架、试管、三角瓶、培养皿、吸管、棉线、纱布、棉花、牛皮纸、报纸、硅胶塞、洗涤剂、去污粉。

2. 仪器

高压蒸汽灭菌锅、电热烘箱。

3. 试剂

3%~5%来苏尔、5%石炭酸、0.25%新洁尔灭、2% NaOH、5%稀盐酸、浓盐酸。

铬酸洗液: 用 $5\sim 10\text{ g K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶于少量热水中,冷却后徐徐加入 100 ml 浓硫酸,搅动,得暗红色洗液,冷后注入干燥试剂瓶中盖严备用。

碱性高锰酸钾洗液: 取 4 g 高锰酸钾溶于少量水后,加入 100 ml 10%的 NaOH 溶液混匀后装瓶备用。洗液呈紫红色。

【实验步骤】

1. 玻璃器皿的清洗

(1) 新购玻璃器皿的清洗

新购买的玻璃器皿上常带有许多干涸的灰尘,同时又含有铅和砷等碱性且对细胞有毒性的物质。在使用前,将器皿放入 5% HCl 溶液中浸泡几小时以中和游离的碱性物质,最后用流水冲洗干净。对容量较大的器皿,如大烧瓶、量筒等,洗净后注入浓盐酸少许,转动容器使其内部表面均沾有浓盐酸,数分钟后倾去浓盐酸,再以流水冲洗干净,倒置于洗涤架上晾干,即可使用。

(2) 旧玻璃器皿的清洗

浸泡 用过的玻璃器皿往往带有大量培养基、激素等残渣,干涸后不易刷洗掉,故用后要立即用清水浸泡。可先用自来水简单刷洗,然后用 5% HCl 浸泡过夜。

刷洗 浸泡后的玻璃器皿一般用毛刷沾洗涤剂洗去玻璃器皿上的杂质。刷洗次数太多,会损害玻璃器皿的表面光洁度,所以宜选用软毛刷和优质的洗涤剂。刷洗时要注意瓶角等部位,不能留有死角。

酸洗 刷洗不掉的极微量杂质经过洗液的强氧化作用可被除掉。洗液是由重铬酸钾、浓硫酸和蒸馏水配制而成,包括强液、次强液和弱液三种,其配方见表 1-1。洗液对玻璃器皿无腐蚀作用,去污十分有效,浸泡时,器皿要充满洗液。铬酸洗液有很强的氧化性,能浸洗去绝大多数污物。洗液可反复使用,呈墨绿色时,说明洗液已失效,不能再继续使用。铬酸洗液成本较高,有腐蚀性和毒性,使用时必须戴上厚的皮手套,不要接触皮肤及衣物。碱性高锰酸钾洗液有强碱性和氧化性,能浸洗去各种油污。洗后若仪器壁上面有褐色二氧化锰,可用盐酸或稀硫酸或亚硫酸钠溶液洗去。碱性高锰酸钾洗液可反复使用,直至碱性及紫色消失为止。

表 1-1 洗液配方

药 品	强 液	次 强 液	弱 液
重铬酸钾 g	63	120	100
浓硫酸 ml	1 000	200	100
蒸馏水 ml	200	1 000	1 000

冲洗 刷洗和洗液浸泡后都必须用水充分冲洗,不留任何残迹,然后用蒸馏水漂洗 2~3 次,晾干备用。

(3) 带菌玻璃器皿的洗涤

凡实验室用过的菌种以及带有活菌的各种玻璃器皿,必须经过高温高压灭菌或消毒后才能进行刷洗。

带菌培养皿、试管、三角瓶等物品,做完实验后应放入高温高压灭菌锅内,用 0.1 MPa 灭菌 20~30 min 后再刷洗。含菌培养皿的灭菌,底盖要分开放入不同的桶中,再进行高压灭菌。带菌的吸管和滴管,使用后不得放在桌子上,应立即放入盛有 3%~5% 来苏尔或 5% 石炭酸或 0.25% 新洁尔灭溶液的玻璃缸(筒)内消毒 24 h 后,再经 0.1 MPa 灭菌 20 min 后,取出冲洗。

2. 塑料器皿的清洗

塑料器皿耐腐蚀能力强,但质地较软,且不耐热,因此它和玻璃器皿清洗方法不同。塑料器皿先用清水充分浸泡和冲洗,再用 2% NaOH 溶液浸泡过夜,用自来水冲洗,然后用 1% HCl 浸泡 30 min,再用自来水冲洗,最后用蒸馏水漂洗 3 次,晾干备用。

3. 滤器的清洗

玻璃滤器与玻璃器皿清洗相同。无论是浸泡还是酸浸,都可用抽滤法。使用后,立即将清水注入滤器,抽气过滤,反复抽滤 5 次。将干净铬酸洗液或热浓硫酸注入滤器,抽气过滤至酸液滤过完毕,再用清水抽滤 10 次,蒸馏水抽气过滤 3 次。蔡氏滤器使用后弃去石棉滤膜,金属部分刷洗干净,最后用蒸馏水漂洗 2~3 次,晾干备用。

新购置的胶塞带有大量滑石粉,先用自来水冲洗干净,常规处理,每次用后的胶塞用水浸泡,然后用 2% NaOH 煮沸 15 min 左右,自来水冲洗,再用 1% HCl 浸泡 30 min,最后用自来水冲洗和蒸馏水漂洗,晾干后备用。

4. 玻璃器材的晾干或烘干

对不急用的玻璃器材,可放在实验室中自然晾干;对急用的玻璃器材,把器材放在托盘中(大件的器材可直接放入烘箱中),再放入烘箱内,用 80~120℃ 烘干,当温度下降到 60℃ 以下再打开取出器材使用。

5. 器皿的包扎

要灭菌后的器皿仍保持无菌状态,需在灭菌前进行包扎。

培养皿:洗净的培养皿烘干后每 10 套叠在一起,用报纸卷成一筒,然后进行灭菌。

吸管:洗净、烘干后的吸管,在吸口的一头塞入少许脱脂棉花,以防在使用时造成污染。塞入的棉花量要适宜,多余的棉花可用酒精灯火焰烧掉。每支吸管用一条宽 4~5 cm 的纸条,以 30°~50° 的角度螺旋形卷起来,吸管的尖端在头部,另一端用剩余的纸条打成一结,以防散开,标上容量,若干支吸管包扎成一束进行灭菌。使用时,从吸管中间拧断纸条,抽出试管。

试管和三角瓶:试管和三角瓶都需要做合适的棉塞,棉塞可起过滤作用,避免空气中的微生物进入容器。制作棉塞时,要求棉花紧贴玻璃壁,没有皱纹和缝隙,松紧适宜。过紧易挤破管口和不易塞入;过松易掉落和污染。棉塞的长度不小于

管口直径的 2 倍,约 2/3 塞进管口。若干支试管用绳扎在一起,在棉花部分外包裹油纸或牛皮纸,再用绳扎紧。三角瓶加棉塞后单个用油纸包扎。

6. 玻璃器材的灭菌

采用干热灭菌: 160~165℃烘箱中灭菌 2 h;或湿热灭菌: 121℃ 20~30 min。

【注意事项】

1. 玻璃器具在清洗和使用前要仔细检查,避免使用有裂痕的仪器。
2. 玻璃器皿因其壁薄,机械强度很低,灭菌和清洗时,必须小心操作。
3. 配制洗液时需小心,注意安全。配制时注意保护身体裸露部分及面部,要戴耐酸手套和耐酸围裙,防止损伤皮肤和衣服。配制过程中加入浓硫酸时将产生大量热量,因此配制的容器需要选用耐酸、耐热、开口大的塑料器皿。加入浓硫酸时宜慢,以免热量产生过多导致器具破裂,发生危险。浸泡时间不能少于 6 h。

【思考题】

1. 干热灭菌和高压蒸汽法适用范围如何?
2. 电热烘箱和高压锅如何操作? 各有哪些使用注意事项?
3. 配制洗液时应注意哪些问题?

实验二 培养基母液的配制

【实验目的】

掌握培养基母液和植物激素母液的配制原理和方法。

【实验原理】

培养基的主要成分包括无机营养物质、碳源、有机物质、植物激素等,由于每种培养基往往含有一二十种化合物,如果每次配制时都要按照成分表依次称量,则配制起来不仅繁琐费时,而且还很难达到准确和精确,尤其是植物激素和微量元素用量较少,难于准确称量,稍有偏差,就会影响试验结果及试验的重复性。为了提高配制培养基的工作效率,在配制培养基前,常常将大量元素、微量元素、铁盐、有机物质、植物激素等分别配制成比培养基配方需要量大 10 倍、100 倍或 1 000 倍的浓缩液,即母液。当配制培养基时,只需要按预先计算好的量吸取母液即可,这样使用方便,节省了大量人力、时间和提高了工作效率。配制母液时,一般按照药品的种类和性质分别配制,所配制的培养基母液应放在 4℃ 冰箱保存备用,发现母液有杂菌污染或出现浑浊或沉淀时不宜再使用,应重新配制。

大量元素一般配成浓缩 10~20 倍的母液,微量元素配成浓缩 100~1 000 倍的母液,铁盐需要单独配制,一般浓缩 100~1 000 倍,有机物质一般浓缩成 100~1 000 倍。生长调节物质需先用酒精、HCl 或 NaOH 溶解后再用水定容,其母液浓度一般配成 0.1~1 mg/ml。

【实验材料、仪器与试剂】

1. 实验材料

烧杯(500 ml、100 ml、50 ml)、容量瓶(1 000 ml、100 ml、50 ml、25 ml)、蓝盖瓶(1 000 ml、100 ml、50 ml、25 ml)、药勺、玻璃棒、电炉、称量纸。

2. 实验仪器

电子天平(感量为 0.000 1 g)、电子天平(感量为 0.01 g)、磁力搅拌器。

3. 实验试剂

NH_4NO_3 、 KNO_3 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、KI、 H_3BO_3 、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、肌醇、烟酸、盐酸吡哆醇(维生素 B_6)、盐酸硫胺素(维生素 B_1)、甘氨酸、IAA、NAA、2,4-D、IBA、KT、6-BA、ZT、 GA_3 、ABA 等。

【实验步骤】

1. 大量元素母液的配制

MS 培养基各大量元素成分按照表 2-1 培养基浓度含量扩大 10 倍,用感量为 0.01 g 的电子天平称取,用蒸馏水分别溶解,按顺序逐个称出,依次加入盛有一定蒸馏水的烧杯中,于磁力搅拌器上逐个搅拌混匀溶解。后用蒸馏水定容到 1 000 ml 的容量瓶中,即为 10 倍的大量元素母液。倒入蓝盖瓶,贴好标签、注明名称及扩大倍数,保存于 4℃ 冰箱中。配制培养基时,每配 1 L 培养基应取该母液 100 ml。

表 2-1 MS 培养基大量元素母液制备

序 号	药 品 名 称	培养基浓度/(mg/L)	扩大 10 称量/mg	配制体积/L
1	NH_4NO_3	1 650	16 500	配 1 L 培养基 取 100 ml
2	KNO_3	1 900	19 000	
3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	4 400	
4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	3 700	
5	KH_2PO_4	170	1 700	

2. 微量元素母液的配制

MS 培养基的微量元素无机盐由 7 种化合物(除 Fe)组成。微量元素用量较少,特别是 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,因此在配制微量元素母液时可将微量元素母液分成微量元素 I ($\times 100$)、微量元素 II ($\times 1\,000$) 分别配制。按照表 2-2、表 2-3 配方,用感量为 0.000 1 g 的电子天平称量,其他配制方法同上。配制 MS 培养基时,每配制 1 L 培养基,取微量元素 I 10 ml,微量元素 II 1 ml。

表 2-2 MS 培养基微量 I 的配制

序 号	药 品 名 称	培养基浓度/(mg/L)	扩大 100 倍称量/mg	配制体积/L
1	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	2 230	配 1 L 培养基 基取 10 ml
2	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	860	
3	H_3BO_3	6.2	620	
4	KI	0.83	83	
5	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	25	

表 2-3 MS 培养基微量 II 的配制

序 号	化合物名称	培养基浓度/(mg/L)	扩大 1 000 倍称量/mg	配制体积/L
1	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	25	配 1 L 培养基 基取 1 ml
2	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	25	

3. 铁盐母液的配制

铁盐不是都需要单独配成母液,如柠檬酸铁,只需和大量元素一起配成母液即可。目前常用的铁盐是硫酸亚铁和乙二胺四乙酸二钠的螯合物,必须单独配成母液。这种螯合物使用起来方便,又比较稳定,不易发生沉淀。铁盐母液常配成 100 倍母液,配制方法同上,直接用蒸馏水加热搅拌溶解。配制培养基时,配制 1 L 取此母液 10 ml。

表 2-4 MS 铁盐母液的配制

序 号	化合物名称	培养基浓度/(mg/L)	扩大 100 倍称量/mg	配制体积/L
1	Na ₂ -EDTA	37.3	3 730	配 1 L 培养基取 10 ml
2	FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	2 780	

4. 有机母液的配制

MS 培养基的有机成分有甘氨酸、肌醇、烟酸、盐酸硫胺素和盐酸吡哆醇。培养基中的有机成分原则上应分别单独配制。有机化合物母液常配成 200 倍母液,配制时直接用蒸馏水溶解,注意称量时用电子分析天平。配制培养基时,配制 1 L 取此母液 5 ml。

表 2-5 MS 培养基有机物质母液的制备

序 号	化合物名称	培养基浓度/(mg/L)	扩大 200 倍称量/mg	配制体积/L
1	甘氨酸	2	400	配 1 L 培养基取 5 ml
2	肌 醇	100	20 000	
3	盐酸硫胺素(VB ₁)	0.4	80	
4	盐酸吡哆醇(VB ₆)	0.5	100	
5	烟 酸	0.5	100	

5. 激素母液配制

植物组织培养中使用的激素种类及含量需要根据不同的研究目的而定。一般激素母液的配制的终浓度以 0.5 mg/ml 或 1 mg/ml 为好,配制的母液装入棕色瓶中,贴好标签,注明母液名称、倍数和日期,放置于 4℃ 冰箱保存备用。

配制激素母液时需要注意以下事项:

(1) 配制生长素类,例如 IAA、NAA、2,4-D、IBA,应先用少量 95% 乙醇或无水乙醇充分溶解,或者用少许 1 mol/L 的 NaOH 溶解,然后用蒸馏水定容到一定的浓度。IAA 易被植物细胞所氧化,故培养基中很少单独使用。

(2) 配制细胞分裂素,例如 KT、6-BA、ZT,应先用少量 95% 乙醇或无水乙醇加 3~4 滴 1 mol/L 的盐酸溶解,再用蒸馏水定容。玉米素不耐热,不能高压灭菌。

(3) 配制赤霉素类,如 GA_3 ,应先用少量 95%乙醇或无水乙醇充分溶解。赤霉素不耐热,不能高压灭菌,需要采用过滤除菌。赤霉素在愈伤组织和悬浮培养物的启动和保持生长时才需要,有时小植株再生时也需要。

(4) 配制脱落酸类,如 ABA,应先用少量 95%乙醇或无水乙醇充分溶解,再用蒸馏水定容。因 ABA 加热易分解,需要采用过滤除菌。

(5) 配制生物素,用稀氨水溶解,然后定容。

【注意事项】

1. 配制 MS 大量元素母液时,某些无机成分如 Ca^{2+} 、 SO_4^{2-} 、 Mg^{2+} 和 H_2PO_4^- 等在一起可能会发生化学反应,产生沉淀物。为避免此现象发生,母液配制时要用纯度较高的重蒸馏水溶解,药品采用等级较高的分析纯,各种化学药品必须先以少量重蒸馏水使其充分溶解后才能混合,混合时应注意先后顺序。特别应将 Ca^{2+} 、 SO_4^{2-} 、 Mg^{2+} 和 H_2PO_4^- 等离子错开混合,速度宜慢,边搅拌边混合。

2. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 要在最后单独加入,在溶解 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 时,蒸馏水需加热沸腾,除去水中的 CO_2 ,以防沉淀。另外, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 放入沸水中易沸腾,操作时要防止其溢出。

3. 在配制铁盐时,如果加热搅拌时间过短,会造成 FeSO_4 和 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 螯合不彻底,此时若将其冷藏, FeSO_4 会结晶析出。为避免此现象发生,配制铁盐母液时, FeSO_4 和 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 应分别加热溶解后混合,并置于加热搅拌器上不断搅拌至溶液呈金黄色(加热 20~30 min),调 pH 至 5.5,室温放置冷却后,再冷藏。

4. 由于维生素母液营养丰富,因此贮藏时极易染菌。被菌类污染的维生素母液,有效浓度降低,并且易给后期培养造成伤害,不宜再用。避免此现象发生的方法是:配制母液时用无菌重蒸馏水溶解维生素,并贮存在棕色无菌瓶中,或缩短贮藏时间。

5. 所有的母液都应保存在 0~4℃ 冰箱中,若母液出现沉淀或霉团则不能继续使用。

6. 使用电子分析天平时注意不要把药品撒到称盘上,用完以后,用洗耳球将天平内的脏物清理干净。

【实验报告】

根据所给母液浓度、蔗糖、琼脂用量、pH,配制培养基 $\text{MS} + \text{KT} 1.0 \text{ mg/L} + \text{BA} 2.0 \text{ mg/L} + \text{NAA} 0.2 \text{ mg/L} + \text{蔗糖 } 3\% + \text{琼脂 } 0.7\%$, pH 5.8。计算各种母液吸取量,填入下表。

药品名称	母液浓度	1 L 培养基母液吸取量	400 ml 培养基母液吸取量
大量元素	10 倍液		
微量元素 I	100 倍液		
微量元素 II	1 000 倍液		
铁 盐	100 倍液		
有机母液	200 倍液		
BA	0.5 mg/ml		
KT	0.5 mg/ml		
NAA	0.5 mg/ml		
蔗 糖			
琼 脂			
pH 值			

【思考题】

配制母液时为什么要按顺序加入各药品？溶解 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 时，为什么要将蒸馏水加热？

实验三 培养基的配制、灭菌及分装

【实验目的】

学习培养基配制、灭菌和分装的操作原理和方法。了解几种常见灭菌方法,掌握干热灭菌法和加压蒸汽灭菌法的原理及其使用方法。

【实验原理】

对植物外植体进行离体培养时,要依靠培养基提供生长所需的营养成分。不同外植体对培养基的要求不同,适宜的培养基类型和组分浓度,对植物组织培养取得成功至关重要。另外,对组织培养物的脱分化和再分化等状态的调控,次生代谢产物的生产等都是通过调节培养基成分来实现的。培养基的主要成分包括无机营养物质、碳源、有机物质、植物生长物质等。

培养基中含有大量的有机物质,特别含糖量较高,是各种微生物滋生、繁殖的好场所。而接种材料需要在无菌条件下培养很长时间,如果培养基被污染,则达不到培养的预期结果。因此,培养基的灭菌,是植物组织培养中十分重要的环节。常用的灭菌方法是高压蒸汽灭菌和过滤除菌。

高压蒸汽灭菌是将待灭菌的物品放在一个密闭的加压灭菌锅内,通过加热,使灭菌锅隔套间的水沸腾而产生蒸汽,待水蒸气急剧地将锅内的冷空气从排气阀中驱尽,然后关闭排气阀,继续加热,此时由于蒸汽不能溢出,而增加了灭菌器内的压力,从而使沸点增高,得到高于 100°C 的温度。导致菌体蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。适用于一般培养基、玻璃器皿、金属用具和无菌水的灭菌。

【实验材料、仪器与试剂】

1. 实验材料

烧杯、量筒、容量瓶、移液管、试剂瓶、三角瓶、玻璃棒、吸耳球、蓝盖瓶、封口膜、称量纸。

2. 实验仪器

电子天平、移液枪、微波炉、高压灭菌锅、冰箱、磁力搅拌器、pH 计。

3. 实验试剂

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 KNO_3 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 NH_4NO_3 、 KH_2PO_4 、 Na_2EDTA 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 H_3BO_3 、KI、 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、甘氨酸、盐酸硫胺素、盐酸吡哆醇、烟酸、肌醇、MS 培养基母液、蔗糖、琼脂粉、 1 mol/L NaOH 、 1 mol/L HCl 。

【实验步骤】

1. MS 培养基的配制(以 1 L MS 培养基为例)

(1) 计量

根据配制培养基的体积和母液的浓度计算需要吸取 MS 各种母液的量,计算公式为:

$$\text{母液吸取量(ml)} = \frac{\text{培养基中物质的含量(mg/L)} \times 1\,000 \text{ ml/}}{\text{母液浓度(mg/L)}}$$

(2) 吸取母液

按照计算吸取母液的量依次吸取各母液置于蓝盖瓶中备用。

(3) 称取蔗糖

称取 30 g 蔗糖放于蓝盖瓶中融化。

(4) 定容

用搪瓷量杯量取 600~700 ml 的蒸馏水倒入蓝盖瓶中,混匀溶解,加水至约 1 000 ml。

(5) 调节 pH

用滴管或移液枪吸取物质当量浓度为 1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 溶液,逐滴滴入 MS 培养基中,边滴边用磁力搅拌器搅拌,并随时用 pH 计或精密的 pH 试纸(5.4~7.0)测量培养基的 pH,一直到培养基的 pH 达到要求为止(在调制时要比目标 pH 偏高 0.2~0.5 个单位,因为培养基在灭菌过程中由于糖等物质的降解, pH 会下降 0.2~0.5 个单位左右)。

(6) 混合溶解

称取 8 g 琼脂粉于蓝盖瓶中,放入微波炉中加热,沸腾后摇动蓝盖瓶直至琼脂完全溶解,得到半透明 MS 培养基。

(7) 植物激素的添加

按照所需植物激素的用量,用移液枪吸取各种植物激素母液,加入蓝盖瓶中混匀。某些生长调节物质(如 GA_3 、ZT、IAA、ABA 等),遇热容易分解,不能进行高压灭菌,必须过滤灭菌。在进行溶液过滤灭菌时,可使用孔径为 $0.45\ \mu\text{m}$ 和更小的细菌滤膜。高压灭菌后,培养基凝固之前并加入植物激素,并轻轻摇动混匀。为此,培养基的装入量和过滤灭菌后的物质都需要事先计算好,定量加入其中。

例如:配制培养基 MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L。

假设:BA、NAA 母液浓度为 0.1 mg/ml,培养基为 400 ml,加 BA 的体积为 x ml,加 NAA 的体积为 y ml,则:

$$1.0 \times 0.4 = 0.1 \times x \quad x = 4 \text{ ml}$$