

0 绪 论

0.1 植物细胞工程的概念和任务

0.1.1 植物细胞工程的概念

植物细胞工程系指在细胞水平上，对植物进行遗传操作的新兴技术。它是一项无菌操作技术（方法或手段）。用该项技术研究在人工控制的条件下，将植物体的任何一部分，或器官、或组织、或细胞进行离体培养，使之成为完整的植物体。所谓人工控制的条件：即营养条件和环境条件；植物体的任何一部分系指根、茎、叶、花、果以及它们的组织切片和细胞。

0.1.2 植物细胞工程的任务

(1) 研究植物器官、组织和细胞在离体培养条件下，所需要的有机营养、无机营养、植物激素等营养条件和刺激因素。

(2) 研究植物器官、组织和细胞，在离体培养条件下，所需的温度、湿度和光照等环境条件。

(3) 研究植物的不同生理年龄、遗传组成（基因型）在离体培养条件下，形态发生的规律。

(4) 研究离体培养条件下再生植株群体的遗传稳定性和变异性。

0.1.3 植物细胞工程的内容

(1) 器官培养 (Organ culture)。器官培养系指对植物根 (Root)、茎 (Shoot)、叶 (Leaf)、花 (Flower)、果实 (Fruit) 以及各部原基 (芽原基、根原基) 的培养。

(2) 胚胎培养 (Embryo culture)。胚胎培养系指以胚珠 (Ovule)、幼胚、成熟胚为材料的离体培养。也包括胚乳 (Endosperm) 的离体培养。

(3) 组织培养 (Tissue culture)。组织培养系指植物各部分组织的离体培养，使之形成愈伤组织称之为组织培养。如：茎组织、叶肉组织、根组织、中

柱鞘、形成层、髓组织、贮藏薄壁组织（大蒜瓣、洋葱、百合鳞片）、珠心组织等。以它们为培养材料进行离体培养。

(4) 细胞培养 (Cell culture)。细胞培养系指用能保持较好分散性的植物细胞或很小的细胞团（6~7 个细胞）为材料进行离体培养。如：生殖细胞（小孢子）、叶肉细胞、根尖细胞、髓组织细胞等。

(5) 原生质体培养 (Protoplast culture)。原生质体培养系指借助某些方法，除去植物细胞的胞壁，培养裸露的原生质体，使其在特定的培养基上，重新形成细胞壁并继续分裂、分化形成植株的方法。

从上面 5 个方面延伸的内容有：植物脱毒培养；突变体筛选；细胞杂交；超低温冷冻贮藏；人工种子等。可见植物细胞工程的内容是非常丰富的，从大到器官小到细胞，乃至脱除细胞壁的原生质体。给这一领域命以一个恰如其分的名称，还是非常必要的。目前出现如下诸多称谓：植物器官、组织和细胞培养 (Organ, Tissue and cell culture of plants)，植物离体培养 (In Vitro Culture of plants)。这两种称谓均不如植物细胞工程 (Plant cell engineering) 来得更确切。同时，《学科分类与代码》国家标准采用“细胞工程” (18.7120)，国家自然科学基金委也用“细胞工程” (C010904) 作为学科代码。

0.2 植物细胞工程的发展历史

植物细胞工程技术的研究始于 1902 年德国植物学家 Haberlandt，至今已有近百年历史。它的发展分为如下几个阶段：

0.2.1 探索阶段 (1902—1929 年)

1902 年，Haberlandt 根据细胞理论 (Schwann, 1939) 大胆地提出：高等植物的体细胞，可以不断分割，直至单个细胞的理论。预言体细胞在适宜条件下，具有发育成完整植株的潜在能力。为了证实这一观点，他用野芝麻、紫鸭跖草等植物的叶栅栏组织、表皮细胞、毛、刺细胞进行离体培养。由于受当时技术和设备的限制，结果仅观察到组织和细胞体积的膨大，而未见到细胞分裂。1904 年，Hannig 在加有无机盐和有机成分的培养基中，培养萝卜和辣根的幼胚，得到了充分发育的胚并提前萌发成小苗。这是离体培养的第一个成功例子。1922 年，Kotte 和 Robbins 离体培养根尖获得成功并在含有无机盐，葡萄糖或果糖、琼脂的培养基上使 1.45~3.75 cm 的豌豆、玉米、棉花茎尖、根尖

培养成苗。1925年，Laibach 培养亚麻种间杂交幼胚获得成功并得到杂种。

0.2.2 技术建立阶段（1930—1940年）

1933年，李继侗将3 mm以上的银杏胚培养成功。同时发现加入胚乳汁可以促进离体胚的生长。1934年，Gautheret 培养三毛柳、黑杨的形成层，成功地得到愈伤组织。培养基是 Knop 液加葡萄糖、酵母提取物、水解酪蛋白的固体培养基。同年，White 将番茄根尖细胞离体培养，得到一个活跃分裂的单细胞无性系。这个无性系一直培养到20世纪60年代。1937年，White 发现B族维生素、吲哚乙酸对植物生长的促进作用。发明了第一个人工合成培养基。1937—1938年，Nabecourt 使胡萝卜根组织经培养而获得愈伤组织并继代培养了几十年。1939年，White 培养烟草的形成层获得愈伤组织。同时使愈伤组织继代培养获得成功。这一阶段，人们对培养细胞的分裂和不分裂的原因尚不能解释，但在李继侗银杏幼胚培养中，由于加入胚乳汁而促进了幼胚发育的启迪下，人们开始注意到离体培养条件下的营养需要。

0.2.3 器官形成和个体发生阶段（1941—1959年）

1941年，Overbeek 等以椰子乳汁作为培养基补加物，使曼陀罗心形期幼胚培养成功。1946年，罗士韦将菟丝子茎尖培养成功并在试管内开花。这给人们以启迪，离体培养技术可以控制花芽的形成。1948年，Skog 和崔澈在烟草茎切段和髓培养以及器官发生的研究中，发现腺嘌呤和腺苷可以解除培养基中生长素(IAA)对芽形成的抑制作用而诱导芽形成。生长素和腺嘌呤的比例是控制芽或根形成的重要条件。1951年，Nitsch 将果实、子房、未受精的胚珠、以及花器官的各个部分培养成功。1953年，Muir 将万寿菊和烟草的愈伤组织，转移到液体培养基中，放在往复式摇床上振荡，获得由单细胞或细胞聚集体组成的细胞悬浮液，而且可以继代繁殖。这是培养方式的突破。1956年，Miller 为了寻找细胞分裂物质，发现了激动素(6-糠基氨基嘌呤)。同时发现激动素代替腺嘌呤促进生芽，其效果增加3万倍。1958年，Steward 和 Shantz 用胡萝卜根韧皮部细胞悬浮培养，从中诱导出胚状体并使其发育成完整小植株。第一次证实 Haberlandt 提出的细胞全能性学说。

0.2.4 技术迅速发展阶段（1960—2000年）

1960年，Cocking 用纤维素酶和果胶酶溶解了番茄根尖的细胞壁，得到了

原生质体。继续培养原生质体，可重新长壁、分裂、分化形成根和芽，最终形成植物体。1960年，Kanata、Rangas Wamy 和 Mahshwari 培养罂粟未受精的胚珠并在试管内撒播花粉，成功地获得能正常发芽的种子。1964—1966年，Guha 和 Maheshwari 培养毛叶曼陀罗的花药，得到由花粉发育来的单倍体植物。1972年，Carlson 在培养两个不同种的粉蓝烟草（*Nicotiana glauca*）和郎氏烟草（*N. langsdorfii*）原生质体时，加入诱导剂（甘露醇、盐类），使两种原生质体发生融合，得到了细胞杂种，而且该细胞杂种经细胞分裂、分化形成完整的杂种植物。随后由加籍华人高国楠在聚乙二醇（PEG）的诱导下，使大豆和粉蓝烟草（科间）融合成功，而且得到3%的异核体。单离培养异核体2~3个月，可分裂出几百万个细胞。1974年，Bonne 和 Eriksson 成功地完成了细胞器（叶绿体）的摄入。将具有叶绿体的海藻和不具有叶绿体的胡萝卜根原生质体，在聚乙二醇诱导下融合成功。观察到16%的活胡萝卜原生质体中，含1至多个叶绿体。试验证明原生质体是引入外源遗传物质的极好材料，为基因工程奠定良好基础。

0.3 植物细胞工程的展望

通过长期反复研究和实践，细胞工程技术逐步发展和完善起来。特别是近20年来，从理论和实践两个方面，有力地推动了生物科学各领域的发展。

0.3.1 植物生理学方面

用该项技术研究植物生长的外界条件，如光、温度、湿度和气体成分；营养条件；植物激素条件等。

0.3.2 植物胚胎学和细胞学

探明胚胎发生条件，胚乳作用，助细胞、反足细胞的作用；乃至从形态发生规律中，探明物种起源；细胞分化和脱分化的条件。

0.3.3 遗传学和育种学方面

遗传学方面应用此项技术研究染色体数量变异和结构变异，染色体工程（基因定位，基因图谱）。育种学方面开辟了新途径，大小孢子培养，试管受精和原生质体融合来克服受精障碍，创造自然界新物种。

0.3.4 病理学方面

研究冠瘿肿瘤的形成；病毒分类及在植物体内的分布；脱除病毒的方法以及病毒快速检测的方法。

0.3.5 基因转化受体的建立

近年来，生物工程技术作为一种高新技术，在生物科学领域中愈来愈显得重要。植物基因工程在以农业生产为广泛应用前景和巨大的经济价值，在众多新兴学科中格外引人注目。离体培养条件下的茎尖分生组织、愈伤组织、单细胞以及脱除细胞壁的原生质体等都是基因工程中，遗传转化的良好受体。外来的遗传信息（基因），通过一定的基因载体（ T_i 或 R_i ）可以引入上述各种类型的细胞。然后通过细胞工程技术，使转基因细胞再生成完整的植物体。由此可见，只有在细胞工程与基因工程紧密结合下，才能使生物工程技术取得突破性进展。

细胞工程技术作为优良的研究手段，从理论和实践两个方面，有力地推动了生物科学各个领域的发展。

1 细胞工程研究的基本设备和无菌操作

1.1 基本设备

从事植物细胞工程操作与其他研究一样，需要建立一套系列实验室，包括洗涤室、灭菌室、配制室、接种室、培养室、鉴定和移植室等。每种实验室均需有专用设备。有了这些设备，再加上培养技术，就可以形成从取材培养到种苗出圃的全套技术系列化。

1.1.1 植物细胞工程实验室的组成

植物细胞工程研究的系列实验室及所应配备的实验设备和器械

洗涤室

需备有鼓风干燥箱、落水架、工作台、水池、水桶、水盆、试管刷等，主要用于玻璃器皿、用具和培养材料清洗；还需有高压水龙头用于冲洗。

灭菌室

需备有高压蒸汽灭菌装置，如直立式、卧式和手提式任何一种装置均可，主要用于固体培养基、器械、棉塞、包头纸等灭菌；细菌过滤器用于液体培养基灭菌；煤气灶或电炉等。

配制室

需备有冰箱、化学实验台、药品柜、器械柜、物品存放架以及各种玻璃器皿和用具，包括不同容积的容量瓶（25 mL、50 mL、100 mL、200 mL）、烧杯（50 mL、100 mL、500 mL、1 000 mL、2 000 mL）、量筒（5 mL、10 mL、50 mL、100 mL、500 mL、1 000 mL）、移液管（0.1 mL、0.2 mL、0.6 mL、1 mL、2 mL、5 mL、10 mL）、三角烧瓶（50 mL、100 mL、150 mL、500 mL）、磨口瓶、广口瓶、试管、各种类型培养瓶（图 1-1）、玻璃棒、移液管架等。用于培养基母液配制和培养基配制。

无菌操作室

需备有超净工作台或接种箱、固定式载物台、移动式载物台、广口瓶、酒精灯、酒精棉、器械支架、手术剪、解剖刀、解剖针、镊子等用于接种（图 1-2）。

培养室

需备有制冷设备、控光设备、固定式培养架、旋转式培养架（转床），转速每分钟 4 转。旋转式摇床（摇床），振速每分钟 60~120 次（低速）或 120~250 次（高速），冲程 3 cm。适用于器官（芽、茎、花药）、愈伤组织、细胞和原生质体的固体或液体培养。

鉴定室

需备有高倍显微镜、倒置显微镜、实体显微镜、恒温箱、切片机、烤片台、恒温水浴、滴瓶、染色缸、载玻片、盖玻片用于细胞学、组织学观察。

驯化移植室

需备有温室、弥雾装置、荫棚、移植床、钵、盆、塑料布、草炭、蛭石、粗沙等，用于试管小植株的锻炼和移植。

1.1.2 基本设备

1.1.2.1 植物细胞工程操作用玻璃器皿和器械

本部分共包括 12 幅图 除图 1-1 图 1-2 外 还有图 1-3 至图 1-12。

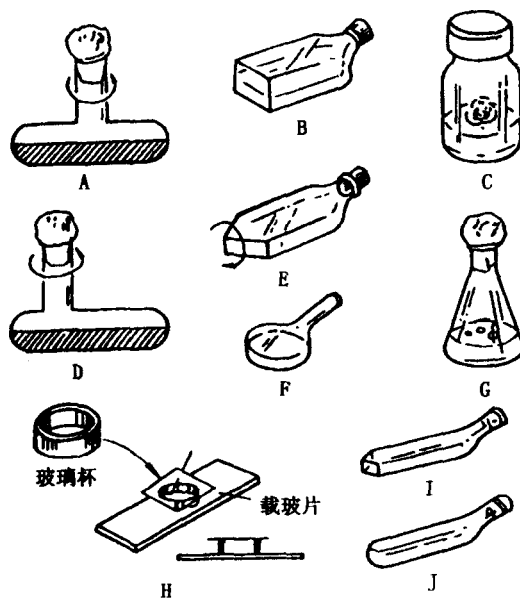


图 1-1 各种类型培养瓶

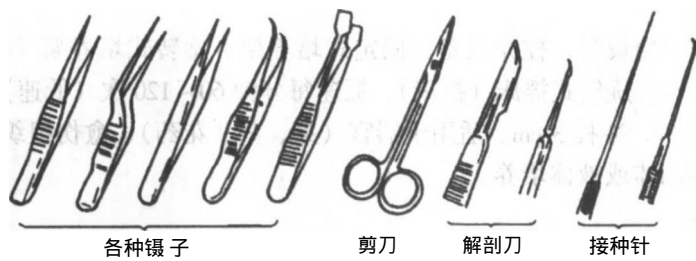


图 1-2 植物组织和细胞培养用器械

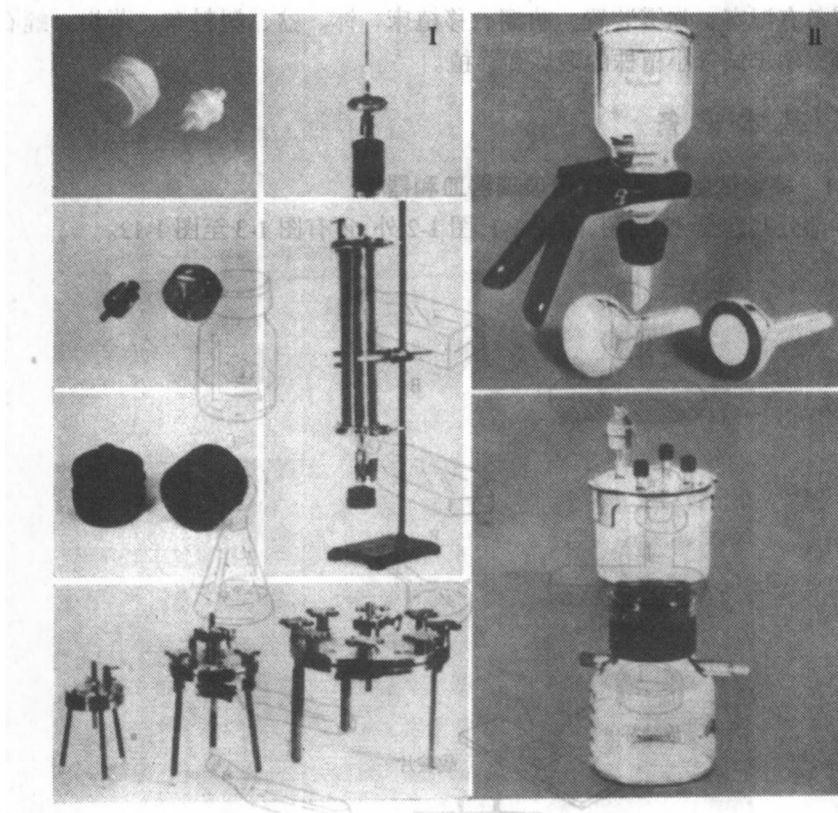


图 1-3 过滤灭菌装置

I 注射器型（微型，左列）；II 抽滤型（右列）

1.1.2.2 无菌操作设备

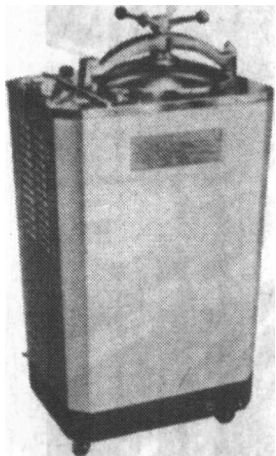


图 1-4 高压湿热灭菌器（锅）
用于固体培养基灭菌

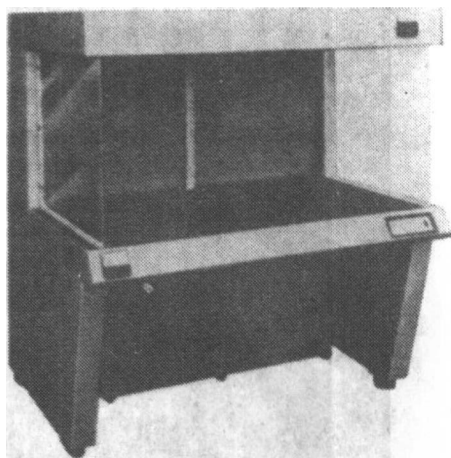


图 1-5 气流水平型净化工作台

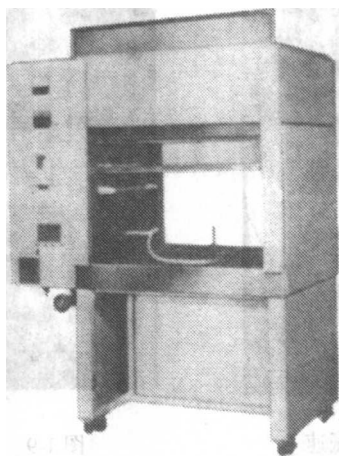


图 1-6 气流垂直型净化工作台

1.1.2.3 培养设备



图 1-7 培养架用于静止培养

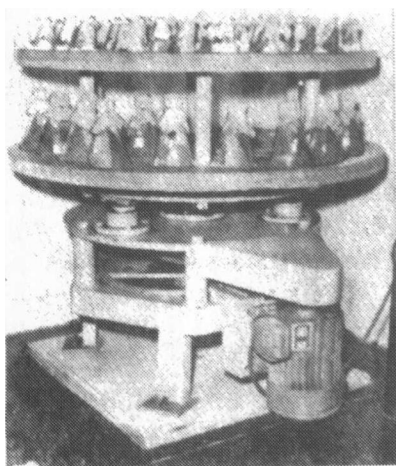


图 1-8 旋转式摇床振速
60~120 次/min 或 120~250 次/min
冲程 10 cm



图 1-9 转床转速为 4 r/min

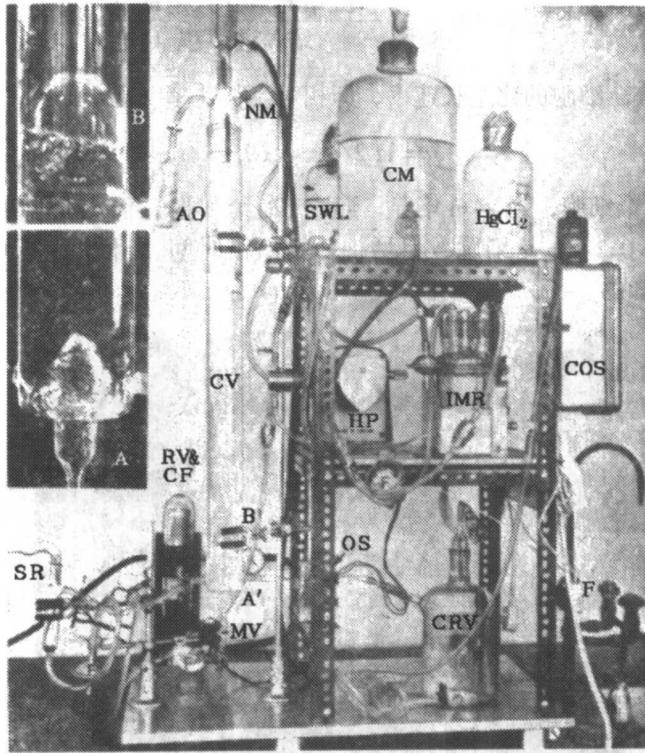


图 1-10 悬浮培养装置: I 带有化学恒定自动控制

CV 培养容器; AO 气体出口; RV 和 CF 减压阀门和碳过滤器; MV 磁力阀; NM 新鲜培养液入口; HP Hughes 微量计量泵; CM 培养液贮存瓶; IMR 培养液中段贮存瓶; CRV 培养材料接收瓶; OS 培养材料流出控制器; COS 电子控制器; HgCl₂ 消毒剂; SWL 无菌水; F 微型空气过滤器

该装置是 Kurz (1971) 为大豆悬浮细胞培养而设计的。从接种到增殖停止, 培养周期为 30 h。培养后的细胞状态为单细胞和两个细胞的聚集体。培养瓶为 2 L 圆柱形平底玻璃管, 该管连接培养液进口、出口、取样口。每隔 2~3 min 从管底部放入空气 1 次。用以搅拌培养液, 防止细胞聚集。培养液进入时间和排出量, 用电子设备控制并使其保持平衡。使细胞稀释速率和增殖速率相同, 可以保持培养液内细胞密度恒定。

化学恒定连续培养时, 新鲜培养液加入速率, 可以根据下列公式计算。

$$\text{稀释速率 } (D) = \frac{\text{新鲜培养液加入速率 } (L/d)}{\text{培养液体积 } (L)}$$

在培养液，细胞的比生长速率，即相对生长速率 (μ)。

$$\mu = \lg 2 / g = 0.69 g$$

如 100 个细胞 经 24 h 培养，形成 120 个细胞。经 48 h 培养形成 144 个细胞，则 $\mu = 0.2$ 。g 是细胞数目增加一倍所需时间。因为 g 是可以测定的，故 μ 也是可知的。

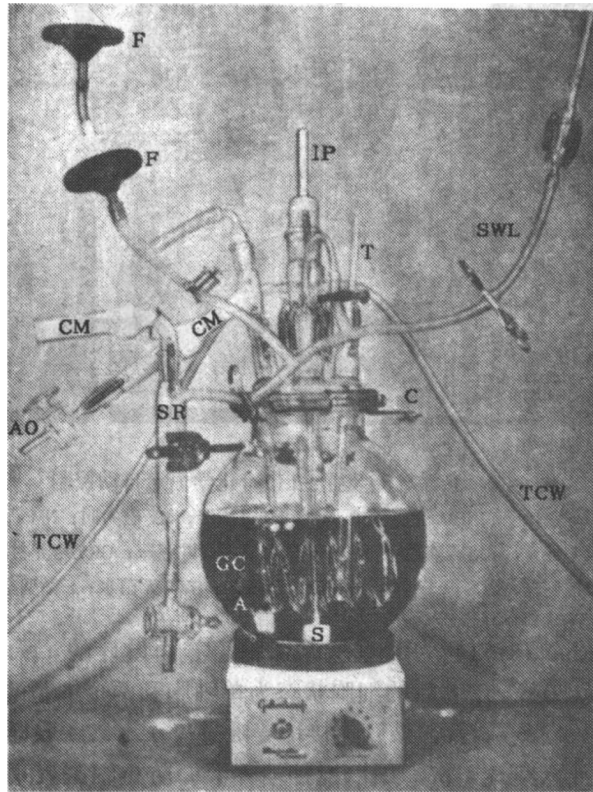


图 1-11 悬浮培养装置：II 带有浊度恒定自动控制
C 夹子；IP 培养液加入孔；AO 气体出口；CM 内有无菌棉花的玻璃管；
A 空气入口；F 微型空气过滤器；GC 蛇形管 TCW 温度控制器；
SR 样品接收瓶；S 磁力搅拌棒；T 温度计；SWL 无菌水

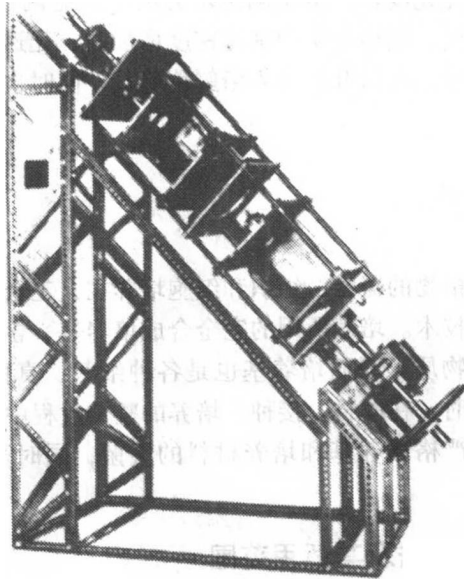


图 1-12 自旋式培养架

培养瓶体积 10~20 L，用于单细胞株的扩大培养，自转速度可据需要调节

浊度恒定自动控制装置 (Wilson, 1971)。该装置的特点，适合于细胞密度低，比生长速率高的培养材料。培养瓶为 5 L 圆底玻璃烧瓶，瓶口外卷，与瓶盖连接处用夹子固定。瓶盖上有 5 个孔，其中作用：①培养液进入孔 (IP)；②气体出口 (AO)，气体排出后进入玻璃过滤器 (CW) 过滤；③空气入口 (A)，使入气玻璃管插至出气玻璃管内，直插培养基底部，成为一根套管。外界的压缩空气，先通过微型过滤器 (F)，再进入空气入口；④温度用蛇形管 (GC) 通过流水控制，用水温控制器 (TCW) 调节流水 (温度)；⑤培养材料从取样口流出后，进入取样瓶 (SR)。样品接收瓶上方，接在盛有无菌棉花的玻璃瓶 (CW) 起过滤作用。取样口和样品接收器之间连接两根管子，其中一根接微型空气过滤器 (F)。每次取样后打开卡夹，使管中的培养材料，全部压回到培养液中，然后关闭。打开另一根管子的卡夹 (SWL)，通过无菌水冲洗管道和样品接收器备用。培养瓶盖上除此 5 孔外，还可插入一根温度计 (T) 并连接温度自控装置，用以检验培养液的温度。培养瓶底部接有磁力搅拌器，以每分钟 200~600 r 的转速，带动不锈钢轴 (S) 转动，起搅拌作用。

用比浊计或分光光度计，定量测定培养液中细胞的混浊度。采用光电计，自动控制培养基浊度。当培养基中细胞密度增加时，光透过减少，同时给培养液入口发出指令信号，入口开放注入新鲜培养基，同时也流出等量的旧的培养液，使体积不变。

1.2 无菌操作

离体培养是将植物的器官、组织和细胞培养在人工合成培养基上，使其发育成完整植物体的技术。培养所用的完全合成培养基，含有植物细胞生长发育所必需的各类营养物质。因而培养基也是各种细菌、真菌滋生繁殖的极好场所。因此离体培养时，在取材、接种、培养的整个过程中，必须建立较强的无菌操作意识。必须严格培养基和培养材料的灭菌，同时严格无菌操作防止污染。

1.2.1 各种灭菌方法及其适用范围

1.2.1.1 干热灭菌法

利用鼓风干燥箱（烘箱）进行烘烤灭菌的方法。此法适用于各种玻璃器皿和器械的灭菌消毒。方法是将清洗后的玻璃器皿和器械放入箱内，将箱温控制在 150°C ，40 min 或 120°C ，120 min，即可达到灭菌效果。

1.2.1.2 湿热灭菌法

利用高压蒸汽灭菌的方法，此法适用于培养基、蒸馏水、各种器械、棉塞、包头纸等的灭菌。将高压蒸汽灭菌锅的压力调至 1.2 kg/cm^2 ，维持 20~30 min，即可达到灭菌效果。一般培养基灭菌掌握在 $1.1\sim 1.2\text{ kg/cm}^2$ 压力，20 min；无菌蒸馏水、器械、棉塞等为 1.2 kg/cm^2 ，30 min；或者 1.3 kg/cm^2 ，20 min。高压蒸汽灭菌时的压力，还需视高压灭菌锅的类型而定。

1.2.1.3 熏蒸灭菌

利用药物熏蒸以达到灭菌的目的。此法适用于接种室和培养室的灭菌。如向甲醛内加入高锰酸钾，促进甲醛的快速挥发而起到熏蒸灭菌的作用。一般每 m^3 用甲醛 2 mL、高锰酸钾 1 g，但是为了避免材料中毒死亡，对有培养材料的培养室，可改用乙二醇加热熏蒸的方法，每 m^3 用乙二醇 6 mL 即可。

1.2.1.4 过滤灭菌

培养基配制过程中，如遇到某些化学物质，经高温高压而易于分解减效或

失效的可以采用细菌过滤器进行过滤灭菌。此法适用于液体培养基和蒸馏水的灭菌。过滤灭菌所使用的滤膜孔径应在 $0.3 \sim 0.45 \mu\text{m}$ 范围内。

1.2.1.5 药剂灭菌

利用 70% ~ 75% 酒精、0.1% ~ 0.2% 升汞（氯化汞）、10% 的次氯酸钠、饱和漂白粉上清液以及新洁尔灭等药剂灭菌的方法。药剂灭菌法适用于培养材料的表面灭菌，药剂灭菌必须根据培养材料的特点，选择适合的药剂种类、浓度和消毒时间。原则上要求既达到灭菌目的，又不能损伤组织和细胞。

1.2.1.6 烧灼灭菌

用酒精灯烧灼以达到灭菌的目的。此法适用于接种器械、瓶口、棉塞、包头纸等灭菌。

1.2.1.7 照射灭菌

用紫外线灯照射灭菌的方法。此法适用于接种室空气和台面的消毒灭菌、在试管受精中可以用于花粉灭菌。紫外线照射时间，一般为 15 ~ 20 min。接种操作时，需注意关闭紫外线灯，否则容易患电光眼。

1.2.2 无菌操作

掌握清洗、消毒和接种无菌操作技术是离体组织培养成功的重要环节。

1.2.2.1 清洗

(1) 玻璃器皿的清洗 用后的玻璃器皿，需立即浸入水中，如遇已被污染的器皿，需先用 70% ~ 75% 的酒精浸泡消毒，然后再清洗。清洗有碱洗法和酸洗法两种。碱洗法是用温热洗衣粉液里外刷洗，再用 60 ~ 70 °C 热水清洗，然后用自来水冲洗，直至洗涤液全部冲净为止，接着用少量蒸馏水洗两遍，置于落水架上晾干。当玻璃器皿上粘有蛋白质类物质或其他有机物时，可采用酸洗法。先用稀盐酸或洗液浸泡，然后用水清洗。

洗液的配制：称量 40 g 工业用重铬酸钾，先用少量水溶解，然后徐徐加入粗制浓硫酸，最后定容至 1 000 mL。

(2) 试验材料的清洗 试验材料来自田间，特别是来自土壤中的幼茎、鳞茎，滋生着各种土壤微生物，特别是细菌的芽孢和真菌的孢子，一旦与培养基接触，就会很快繁殖起来，从而造成培养基和培养材料的污染。因此，试验材料必须经过严格的清洗。

清洗方法：从田间取回材料，视其清洁程度，先用自来水流水冲洗 5 min，然后用中性洗衣粉（液）清洗，注意勿损伤试验材料。再用自来水流水冲洗

0.5 h, 以备药剂灭菌

1.2.2.2 灭菌

无菌操作中的灭菌, 包含很多内容, 这里重点谈谈培养材料的灭菌和培养基的灭菌。

(1) 培养材料的灭菌。把好材料“灭菌关”是提高接种成功率的关键。无菌培养之前, 首先要得到无菌材料, 获得无菌材料的方法, 主要是用药剂进行表面灭菌。具体做法是将清洗后的植物材料, 在一定浓度的药液中浸泡灭菌。使用的药剂种类、浓度和处理时间需根据材料对药剂的敏感性来决定。一方面要考虑药剂对各种菌类的杀灭效果, 从中选择具有高效的杀菌剂; 另一方面, 还应考虑到植物材料对杀菌剂的耐受力, 也就是说, 不能因为选择了强杀菌剂, 而使组织和细胞受到损伤和被杀死。至于各种药剂的使用浓度和浸泡时间, 也应依据植物种类和取用的器官部位的不同进行灭菌试验。现将离体培养中常用的灭菌剂, 使用浓度、灭菌时间以及灭菌效果列表比较(表 1-1)。

表 1-1 常用的灭菌药物种类、浓度及其效果

药物种类	浓度(%)	灭菌时间(min)	效果
酒精	70~75	0.1~5	(+)好
升汞(氯化汞)	0.1~0.2	8~25	(+++)最好
漂白粉	饱和上清液	8~15	(++)很好
次氯酸钠	2	5~30	(++)很好
次氯化钙	9~10	5~30	(++)很好

器官外植体的灭菌, 采用单一灭菌剂往往收不到良好的效果, 一般常采用多种药剂配合使用的方法。表面具有较厚的蜡质层, 灭菌药剂不易粘着的材料。在药剂灭菌时, 加入少量浸润剂如吐温-20, 或吐温-80, 可以收到良好的效果。表 1-2 以酒精和升汞(氯化汞)为例说明多种药剂配合使用对不同器官的灭菌顺序。

(2) 培养基灭菌。培养基灭菌是植物材料离体培养中十分重要的环节。培养基灭菌方法有高压蒸气灭菌和过滤灭菌两种方法。高压蒸汽灭菌法是采用饱和水蒸汽灭菌的方法, 此法适用于固体培养基的灭菌。过滤灭菌法适用于液体培养基的灭菌。

高压蒸汽灭菌注意事项:

①高压蒸汽灭菌锅装锅不可过满, 需使锅内具有一定空间, 便于热蒸汽的

上下回流，才能收到良好灭菌效果。

表 1-2 不同器官的灭菌顺序

器官种类	灭菌顺序		
	灭菌前	药剂浓度和时间	灭菌后
茎尖	严格清洗	70%酒精浸 3~5 min 倒出，再用 0.1%~0.2% 升汞加一两滴吐温 - 20，浸 20~30 min 倒出	用无菌蒸馏水冲洗三四次，接种培养
腋芽	严格清洗	70%酒精浸 3~5 min 倒出，再用 0.1%~0.2% 升汞加一两滴吐温 - 20，浸 20~30 min 倒出	用无菌蒸馏水洗三四次，接种培养
花蕾		70%酒精浸 6~7 min 倒出，再用 0.2% 升汞加 1~2 滴吐温 - 20，浸 8~10 min 倒出	用无菌蒸馏水冲洗三四次，取花药接种培养
种子	在 50~52℃ 温汤浸种，然后在 28℃ 下维持一定时间，使种皮软化	70%酒精浸 3~5 min 倒出，0.2% 升汞加一两滴吐温 - 20，浸泡 20~30 min 倒出	用无菌蒸馏水冲洗三四次后，在培养基上无菌发芽

锅内冷空气必须排尽，否则压力表指针虽然达到规定压力，但由于锅内冷空气的存在，并达不到相应的温度，因而影响灭菌效果。饱和蒸汽压力及其相对应的温度关系，见表 1-3。

表 1-3 饱和蒸汽压力与其对应的温度

饱和蒸汽压力		温度	饱和蒸汽压力		温度
kg/cm ²	(磅/英寸)	(℃)	kg/cm ²	(磅/英寸)	(℃)
0.0	(0)	100	1.055*	(15)*	121.0
0.141	(2)	103.6	1.125	(16)	122.0
0.281	(4)	106.9	1.266	(18)	124.1
0.442	(6)	109.8	1.406	(20)	126.0
0.563	(8)	112.6	1.543	(22)	127.8
0.703	(10)	115.2	1.681	(24)	129.6
0.844	(12)	117.6		(30)	134.5
0.984	(14)	119.9		(50)	147.6

* 约相当于 1 个大气压力，1 个标准大气压 = 101 325 Pa

锅内达到一定压力后，注意在保持压力的过程中，严格遵守时间。时间