

## 外植体消毒步骤:

- 1、花蕾、花瓣、叶片的消毒:取未开放的小花蕾,花苞的里层花瓣,幼嫩的叶片置清水中洗两到三遍,在无菌条件下,用75%的酒精消毒30S,用0.1%的升汞消毒8min,用无菌水冲洗4-5遍,在整个灭菌和清洗过程中,应不停地摇动瓶子,使材料充分与消毒液和清洗液接触。然后将材料接到培养基上。
- 2、脚芽的消毒:取3cm左右的脚芽,去掉展开的叶片,将材料置清水中洗两到三遍,在无菌条件下,用75%的酒精消毒30S,用0.1%的升汞消毒4min左右,用无菌水冲洗4-5遍,在整个灭菌和清洗过程中,应不停地摇动瓶子,使材料充分与消毒液和清洗液接触。然后将材料接到培养基上。

## 幼胚拯救实验步骤

- 1、授粉后15-18d(以第2次为止,ps:第2次隔第1次1-2d),将其花序取回实验室里(自封袋+少量水)
- 2、将小花用镊子轻剥下,放入双层纱布包裹(不松不紧为宜),等待幼胚拯救
- 3、将加有6-BA:NAA=2:0.5MS培养基连同5瓶水(灭过菌)、培养皿、剪刀、解剖针、镊子放入组培台中,组培台内配置同常规
- 4、将一个灭过菌的空三角瓶(500ml)待灭菌结束后打开,装入包裹好的纱布中,加入75%酒精,摇晃30s,放入组培台中,30s过后,将酒精倒出,1)加入升汞(0.1%),灭菌4min30s;或2)加入双氧水(15%),灭菌10min;不停摇晃直至结束,将灭菌结束后的纱包用镊子夹出,取一瓶灭菌水将其加入,不停摇晃清洗2min,结束后用镊子夹入放入第二瓶水中3min,再次重复,第3瓶水4min,第4瓶水5min,第5瓶水5min,然后,点燃酒精灯
- 5、取出培养皿(盖+带滤纸),此期间,将剪刀,镊子,解剖针烧3次,并取出最后水洗过的纱包,放入培养皿盖中,用剪刀剪开纱布,开始幼胚拯救
- 6、取一滤纸作工作台,用镊子夹取适量小花,放到滤纸上,用镊子与解剖针剥出胚珠,集齐一定数量胚珠,以第一胚珠不干不

燥为准，将其放入培养基（少量）。重复此操作，直至结束，记号笔表明放入培养室培养。

PS：关于消毒剂的类别和灭菌时间，视具体情况而定，