**实验三 愈伤组织的诱导**

**一、实验目的**

巩固无菌操作技术；掌握愈伤组织的诱导培养方法；了解愈伤组织的形态特征。

**二、实验原理**

在适宜的离体培养条件下，已经分化的外植体细胞会发生脱分化而恢复其分裂能力，形成无序生长的薄壁细胞团，即愈伤组织。培养基中的激素配比是影响愈伤形成的关键因素。

**三、实验材料、仪器及用品**

1、材料：实验2培养的甜瓜无菌苗，每人（2人）1瓶。（或烟草苗）

2、仪器及用品：超净工作台，高压灭菌锅，光照培养箱，酒精灯，小喷壶；灭菌的不锈钢镊子、剪刀、解剖刀、培养皿各33个；灭菌蒸馏水8份；实验1配制的愈伤组织诱导培养基每人1瓶；75%乙醇。

**四、实验内容及操作方法**1）用75%酒精喷雾、擦拭超净工作台，并将除无菌苗以外的实验用具用75%乙醇喷雾后放入超净工作台中，然后打开超净工作台风机和紫外灯，照射灭菌20min。

2） 在自来水管下将手洗净，然后用75%乙醇将手消毒，再进入超净工作台操作。
3） 点燃酒精灯，打开已灭过菌的剪刀、镊子、解剖刀和培养皿等。

4） 将培养无菌苗的三角瓶用75%酒精喷雾后放入超净工作台，在酒精灯火焰前取下封口膜，用镊子将无菌苗夹取到培养皿中，然后剪取5-6片子叶，剪去叶边缘，并将其剪成3~5mm见方的小片，最后用镊子将其接种于愈伤组织诱导培养基上，每瓶接种8-12片。
5） 快速封好瓶口，在瓶壁上标好姓名和接种日期。
6） 将接种后的三角瓶置于25℃下暗培养一周，然后在同样温度下进行每天16h光照和8h黑暗培养，直至愈伤组织形成。

注意事项：

1）剪切外植体时动作要快，以免造成失水而影响外植体活力。为防止失水，也可在培养皿中滴几滴无菌水进行剪切。

2）操作时双手远离培养皿和三角瓶口，以免污染。

**五、观察记载内容与实验报告**1、观察记载内容：每瓶接种数，4人小组接种总数，外植体的变化，愈伤形成的时间、数目及其形态特征，污染情况（3天后开始观察）。

2、实验报告：每人一份。

1） 实验目的

2） 实验原理

3） 实验方法：用流程图表示愈伤组织的培养方法。

4） 实验结果与分析

A. 描述愈伤的形成过程及其形态特征；

B. 统计愈伤诱导率与污染率，分析引起污染的原因。