

柑橘幼胚抢救培养

袁东亚，郭文武*

园艺植物生物学教育部重点实验室，园艺林学学院，华中农业大学，武汉

*通讯作者邮箱：guoww@mail.hzau.edu.cn

引用格式：袁东亚，郭文武. (2018). 柑橘幼胚抢救培养. *Bio-101* e1010189. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010189.

实验原理和目的：在果树育种中一些常用的育种方法如远缘杂交、二倍体与四倍体杂交等，获得的合子胚往往在发育的早期阶段就败育或退化。通过胚抢救，将可能败育或退化的胚从母体内分离出来，经过适宜的培养，获得再生植株。

关键词：合子胚，败育，胚抢救

材料与试剂

1. 柑橘幼果
2. 平底试管
3. 培养皿 (100 x 15 mm)
4. 滤纸
5. 吸水纸
6. 乙醇
7. 培养基 (见柑橘组织培养常用培养基配制方法 [杨雯惠和郭文武, 2018])
 - 1) MT 培养基
 - 2) 生芽培养基
 - 3) 生根培养基

仪器设备

1. 镊子
2. 手术刀柄
3. 刀片

4. 酒精灯
5. 4 °C 冰箱
6. 超净工作台
7. 光培室
8. 流式细胞仪 (Partec)

实验步骤

1. 果实消毒和取种

1.1 于授粉后80-90 d, 采摘授粉的幼果用于胚抢救 (若果实较多, 可分多次采摘), 将幼果带回实验室暂置于4 °C冰箱保存。

注: 存放时间不宜过长, 尽快进行胚抢救, 不同品种的果实适宜采摘的时期不同。

1.2 将果实放在流水下清洗, 洗去果实表面的污垢。

1.3 实验开始前, 将超净台紫外灭菌20-30 min, 用75%酒精 (或工业酒精) 擦拭台面, 并将镊子、手术刀在酒精中浸泡15 min, 然后置于酒精灯外焰燃烧, 冷却备用。

注: 镊子和刀经过培养皿的部分都要烧到, 确保灭菌彻底。

1.4 无菌条件下, 将幼果置于75%酒精中浸泡15 min (每次浸泡2-3个果)。用镊子插入果实, 置于酒精灯上燃烧消毒, 每个果子2-3 min, 燃烧时间过长会使种子死亡。

1.5 待果实消毒完全后, 用手术刀将果皮切除, 先使用镊子将质胞除去, 再将种子取出, 取种子的时候注意不要碰伤胚。

1.6 用手术刀将种子合点端 (种子尾部、呈粉红色) 切开一个较大的口子。将其基部朝下插入到萌发培养基中, 深度为种子的一半。柚类的种子在该时期已有肉眼可见的胚, 对于该类种子, 可直接将胚从种子中分离, 置于萌发培养基上离体培养。

注: 最好使用新配置的培养基。

2. 胚培养

- 2.1 光照培养室培养条件为：温度 (25 ± 1) °C，湿度70%左右，每天光照16 h。光培一个月之后，将形成的胚状体挑出 (尽量保证胚的完整) 转入生芽培养基中进行生芽诱导培养，未萌发的种子要及时继代 (一般1个半月左右继代一次)。
- 2.2 待芽长出2-3片叶后将其切下 (切口呈45°角)，转入生根培养基中诱导生根，根系形成后，即可对再生植株取样进行倍性检测 (详见流式细胞仪倍性测定方法)。

参考文献

1. 解凯东, 王惠芹, 王晓培, 梁武军, 谢宗周, 伊华林, 邓秀新, Grosser, J. W., 郭文武. (2013). [单胚性二倍体为母本与异源四倍体杂交大规模创制柑橘三倍体](#). *中国农业科学* 46(21): 4550-4557.
2. 宋健坤, 郭文武, 伊华林, 刘继红, 陈春丽, 邓秀新. (2005). [以异源四倍体体细胞杂种为父本与二倍体杂交创造柑橘三倍体的研究](#). *园艺学报* 30(4): 594-598.
3. 杨雯惠, 郭文武. (2018). [柑橘组织培养常用培养基配制方法](#). *Bio-101* e1010184. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010184.