

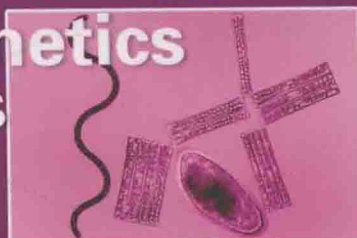
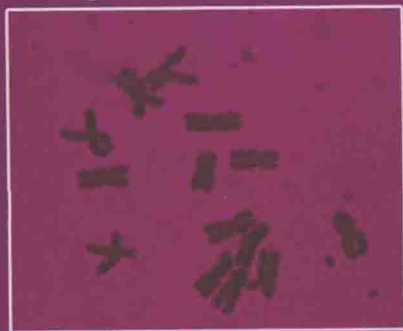


全国高等农林院校生物科学类
专业“十二五”规划系列教材

遗传学实验指导

于翠梅 马莲菊 **主编**

Guide of Genetics
Experiments



中国农业大学出版社

CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS

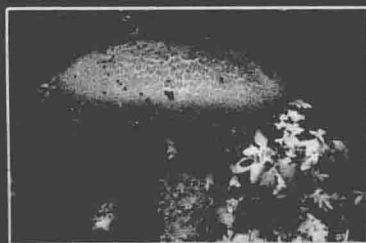
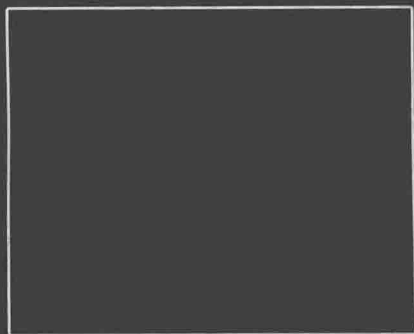


全国高等农林院校生物科学类
专业“十二五”规划系列教材

遗传学实验指导

于翠梅 马莲菊 主编

Guide of Genetics
Experiments



 中国农业大学出版社
CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS

类学球世生郊制林亦等高国全

林媒区系版第“正二十”业专



内 容 简 介

本实验教材设置了遗传的物质基础、遗传定律及其验证、细胞质遗传、细菌和病毒遗传、数量性状遗传、近亲繁殖与杂种优势、群体遗传、染色体畸变、分子遗传等9章共32个实验。实验项目选择既注重基础的遗传学实验,如细胞分裂制片与观察、染色体分析及遗传定律验证;又跟踪前沿的实验技术,如DNA和RNA提取鉴定技术、植物数量性状的QTL定位分析及SSR分子标记的遗传分析;同时还结合遗传学在植物育种实践中的应用技术,如植物雄性不育的鉴别、植物杂种优势测定与分析及农杆菌介导的植物遗传转化技术。

图书在版编目(CIP)数据

遗传学实验指导/于翠梅,马莲菊主编. —北京:中国农业大学出版社,2015.8

ISBN 978-7-5655-1361-9

I. ①遗… II. ①于…②马… III. ①遗传学-实验-高等学校-教材 IV. ①Q3-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第181955号

书 名 遗传学实验指导

作 者 于翠梅 马莲菊 主编

策划编辑 孙 勇 潘晓丽

责任编辑 韩元凤

封面设计 郑 川

责任校对 王晓凤

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路2号

邮政编码 100193

电 话 发行部 010-62818525,8625

读者服务部 010-62732336

编辑部 010-62732617,2618

出 版 部 010-62733440

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

E-mail cbsszs@cau.edu.cn

经 销 新华书店

印 刷 涿州市星河印刷有限公司

版 次 2015年8月第1版 2015年8月第1次印刷

规 格 787×1092 16开本 9.25印张 230千字

印 数 1~3000

定 价 21.00元

图书如有质量问题本社发行部负责调换

全国高等农林院校生物科学类专业“十二五”规划系列教材 编审指导委员会 (按姓氏拼音排序)

姓 名	所 在 院 校	姓 名	所 在 院 校
蔡庆生	南京农业大学	刘国琴	中国农业大学
蔡永萍	安徽农业大学	刘洪章	吉林农业大学
苍 晶	东北农业大学	彭立新	天津农学院
曹贵方	内蒙古农业大学	秦 利	沈阳农业大学
陈雯莉	华中农业大学	史国安	河南科技大学
董金皋	河北农业大学	宋 渊	中国农业大学
冯玉龙	沈阳农业大学	王金胜	山西农业大学
郭 蓓	北京农学院	吴建宇	河南农业大学
郭立忠	青岛农业大学	吴晓玉	江西农业大学
郭图强	塔里木大学	殷学贵	广东海洋大学
郭兴启	山东农业大学	余丽芸	黑龙江八一农垦大学
郭玉华	沈阳农业大学	张 炜	南京农业大学
李 唯	甘肃农业大学	赵 钢	仲恺农业工程学院
林家栋	中国农业大学出版社	赵国芬	内蒙古农业大学

内容简介

“十二五”国家重点图书出版规划项目 编写人员 主编 于翠梅 林亦蓉 高国金

近亲繁殖与物种选择... 33个实验... DNA和RNA提取... 遗传分析... 植物遗传转化技术。

主 编 于翠梅(沈阳农业大学)
马莲菊(沈阳师范大学)

副主编 李春红(沈阳农业大学) 刘 颖 李 颖

程海涛(沈阳农业大学) 王 颖

胡超越(塔里木大学) 李 颖

卜 宁(沈阳师范大学) 李 颖

参 编 王宏伟(山东农业大学) 王 颖

王 彬(河南科技大学) 王 颖

张 欣(天津农学院) 王 颖

施利利(天津农学院) 王 颖

曹秀云(沈阳农业大学) 王 颖

曹 萍(沈阳农业大学) 王 颖

王升厚(沈阳师范大学) 王 颖

郑 国(沈阳师范大学) 王 颖

王 颖

王 颖

王 颖

王 颖

王 颖

王 颖

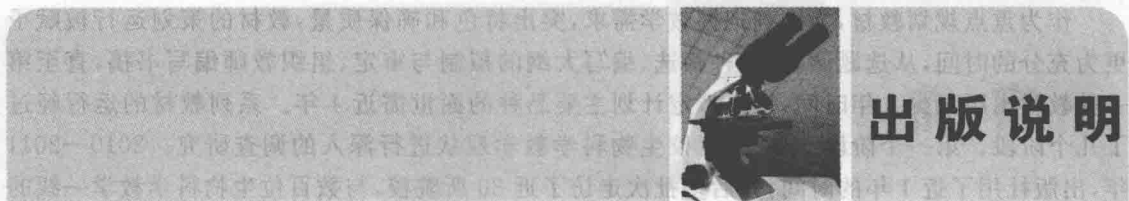
王 颖

王 颖

王 颖

图书如有质量问题本社发行部负责调换

业守英等林博主对制材考次跟查件林博院系次科工始原真入门案考。能登博科等博的富丰
。意衡察察理新出弃,脚基的尖并了宝莫特特品研



。国同的否存及另非界组由学博学博主对制材考考高因非独了人第,刻溯行也种殊味家步
亦国中味制学博主大业亦国中,份具12年105。会村福安基林博味学博礼序,这制个二深
籍考升会已,会村博学博主制材考考高100,对制材余30育了开序博博其博出考大业
了就

生物科学是近几十年来发展最为迅速的学科之一,它给人类的生产和生活带来巨大变化,尤其在农业和医学领域更是带来了革命性的变革。生物科学与各个学科之间、生物科学各个分支学科之间的广泛渗透,相互交叉,相互作用,极大地推动了生物科学技术进步。生物科学理论和方法的丰富和发展,在持续推动传统农业和医学创新的同时,其应用领域不断扩大,广泛应用的领域已包括食品、化工、环保、能源和冶金工业等各个方面。仿生学的应用还对电子技术和信息技术产生巨大影响。生物防治、生物固氮等生物技术的应用,极大地改变了农业过分依赖石化工业的局面,继而为自然生态平衡的恢复做出无可替代的贡献。以大量消耗资源为依赖的传统农业被以生物科学和技术为基础的生态农业所替代和转变。新的、大规模的现代农业将由于生物科学的快速发展而迅速崛起。

生物科学在农业领域中越来越广泛的应用以及不可替代作用的发挥,既促进了生物科学教育的发展,也为生物科学教育提出了新的更高的要求。农业领域高素质、应用型人才对生物科学知识的需求具有自身独特的使命和特征。作为培养高素质、应用型人才重要途径和方式的农业高等教育亟需探索出符合实际需求和发展的教育教学模式和内容。为此,中国农业大学生物学院和中国农业大学出版社与全国30余所高等农林院校合作,在充分汲取各校生物科学类专业教改实践经验和教改成果的基础上,经过进一步集成、融合、优化、提升,凝聚形成了比较符合农林院校教学实际、适应性更好、针对性更强、教学效果更佳的教学理念和教材编写思路,进而精心打造了“全国高等农林院校生物科学类专业‘十二五’规划系列教材”。系列教材覆盖了近30门生物科学类专业骨干课程。

本系列教材站在生物科学类专业教育教学整体目标的高度,以学科知识内容关联性为依据,审核确定教材品种和教材内容,通过相关课程教材小规模组合、专家交叉多重审定、编审指导委员会统一把关等措施,统筹解决相关教材内容衔接问题;以统一的编写指导思想因课制宜确定各门课程教材的编写体例和形式。因此,本系列教材主导思想整体归一、各种教材各具特色。

农业是生物科学最早也是应用范围最广的领域,其厚重的实践积累和丰硕成果使得农业高等教育生物科学类专业教学独具特色和更高要求。本系列教材比较好地体现了农业领域生物科学应用的重要成果和前沿研究成就,并考虑到农林院校生源特点、教学条件等,因而具有很强的适用性、针对性和前瞻性。

系列教材编审指导委员会在教材品种的确定、内容的筛选、编写指导思想以及质量把关等环节中发挥了巨大作用。其组成专家具有广泛的院校代表性、学科互补性和学术权威性,以及

丰富的教学科研经验。专家们认真细致的工作为系列教材打造成为农林院校生物科学类专业精品教材奠定了扎实的基础,在此谨致深深谢意。

作为重点规划教材,为准确把握教学需求,突出特色和确保质量,教材的策划运行被赋予更为充分的时间,从选题调研、品种筛选、编写大纲的拟制与审定、组织教师编写书稿,直至第一种教材出版至少3年时间,按照拟定计划主要品种的面世需近4年。系列教材的运行经过了几个阶段。第一个阶段,对农林院校生物科学教学现状进行深入的调查研究。2010—2011年,出版社用了近1年的时间,先后多批次走访了近30所院校,与数百位生物科学教学一线的专家和教师进行座谈,深入了解我国高等农林院校生物科学教学的进展状况及存在的问题。第二个阶段,召开教学和教材建设研讨会。2011年12月份,中国农业大学生物学院和中国农业大学出版社组织召开了有30余所院校、100余位教师参加的生物教学研讨会,与会代表就农林院校生物科学类专业教学和教材建设问题进行了广泛和深入的研讨,会上还组织参观了中国农业大学生物学院教学中心、国家级生命科学实验教学示范中心以及两个国家重点实验室,给与会代表留下了深刻的印象和较大的启发。第三个阶段,教材立项编写。在广泛达成共识的基础上,有30多所高等农林院校、近500人次教师参加了系列教材的编写工作。从2013年4月起,系列教材将陆续出版,希望这套凝聚了广大教师智慧、具有较强的创新性、反映各校教改探索实践经验与成果的系列教材能够对农林院校生物科学类专业教育教学质量的提高发挥良好的作用。

良好的愿望和教学效果需要实践的检验和印证。我们热切地期待着您的意见反馈。

中国农业大学生物学院

中国农业大学出版社

2013年3月16日

前言



遗传学是生物学科重要的分支学科,遗传学实验作为整个学科教学体系中的一个重要环节,在知识与实践、实践与创新的链接上发挥着重要的桥梁作用。遗传学实验教学不仅是为了验证遗传学的基础理论和掌握一些实验技术,更重要的是要提高学生的科学研究能力,培养学生的探索精神、创新意识和创新能力。为此,编者根据多年的实验教学体会,结合参编学校和多数高校的教学大纲、实验教学条件和生源特点,编写了此书。

本实验教材设置了遗传的物质基础、遗传定律及其验证、细胞质遗传、细菌和病毒遗传、数量性状遗传、近亲繁殖与杂种优势、群体遗传、染色体畸变、分子遗传等9章共32个实验,实验内容依据遗传学的内在逻辑,以基因为主线,涵盖了遗传物质的本质、遗传物质的传递和遗传信息的表达范围内的基本实验技术。

所选用的实验材料既包含果蝇、粗糙链孢霉、大肠杆菌、小鼠等遗传学研究的模式生物,又包含水稻、玉米、小麦、人体等遗传学应用于实践的生物材料。

实验项目选择既注重基础的遗传学实验,如细胞分裂制片与观察、染色体分析及遗传定律验证;又跟踪前沿的实验技术,如DNA和RNA提取鉴定技术、植物数量性状的QTL定位分析及SSR分子标记的遗传分析;同时还结合遗传学在植物育种实践中的应用技术,如植物雄性不育的鉴别、植物杂种优势测定与分析及农杆菌介导的植物遗传转化技术。

在具体每个实验项目编写中,我们结合教学和科研工作中的实践经验,力求在实验材料的选择、实验仪器的配备、实验操作方法、步骤等方面更加简便适用,使学生少走弯路;另外,注意介绍与实验相关的知识,扩大学生的知识面;同时,还展示了编者在实验教学和科研工作中拍摄、制作的大量相关试验照片和图片,便于学生对实验内容和遗传学理论有更加直观的理解。

本实验教材具有综合性和实用性强的特点,教师可以根据教学的实际进行选择和调整。本教材采用传统遗传学由宏观到微观的编写体系,可以与中国农业大学出版社出版的《遗传学》(郭玉华主编)教材配套使用。本书广泛适用于植物生产类及生物技术类的师生使用。

编者

2015年6月

实验十四 大肠杆菌的转化实验	33
实验十五 大肠杆菌接合与基因定位——中链杂交实验	36
第5章 数量性状遗传	50
实验十六 数量性状的遗传分析	50
实验十七 植物数量性状的QTL定位分析	62
实验十八 人类复杂性状遗传学分析	67



目 录

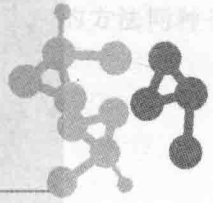
18	变异的白菜 章 8 款	
18	变异的紫叶酢浆草 二十二款	
68	变异的紫叶酢浆草 二十二款	
第 1 章 遗传的物质基础		1
实验一	植物有丝分裂的制片和观察	1
实验二	植物减数分裂的制片和观察	4
实验三	永久片制作	7
实验四	植物细胞染色体组型分析	10
实验五	动物骨髓细胞染色体组型制片	14
实验六	果蝇唾腺多线染色体观察	17
实验七	人体 X 染色质的检测与观察	20
第 2 章 遗传定律及其验证		23
实验八	植物的有性杂交	23
实验九	玉米籽粒性状的遗传分析	29
实验十	果蝇生活史及性状的观察	36
实验十一	果蝇的杂交实验与性状的遗传分析	39
实验十二	粗糙脉孢菌的杂交实验	43
第 3 章 细胞质遗传		47
实验十三	植物雄性不育的观察和鉴定	47
第 4 章 细菌和病毒遗传		53
实验十四	大肠杆菌的转化实验	53
实验十五	大肠杆菌接合与基因定位——中断杂交实验	56
第 5 章 数量性状遗传		60
实验十六	数量性状的遗传分析	60
实验十七	植物数量性状的 QTL 定位分析	62
实验十八	人类指纹的遗传学分析	67



第 6 章 近亲繁殖与杂种优势	72
实验十九 植物杂种优势测定与 F ₂ 衰退现象的观察	72
第 7 章 群体遗传	76
实验二十 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律的验证	76
实验二十一 人群中 PTC 味觉基因频率的分析	78
第 8 章 染色体畸变	81
实验二十二 辐射诱发植物染色体变异的观察与鉴定	81
实验二十三 植物多倍体的诱发与鉴定	83
实验二十四 染色体结构变异观察与鉴定	86
实验二十五 蚕豆根尖细胞微核实验	89
实验二十六 小白鼠骨髓嗜多染红细胞微核及精子畸形实验	91
第 9 章 分子遗传	95
实验二十七 质粒 DNA 的提取与鉴定	95
实验二十八 植物基因组 DNA 的提取与鉴定	99
实验二十九 植物总 RNA 的提取与鉴定	102
实验三十 SSR 标记的检测分析	105
实验三十一 植物组织培养技术	109
实验三十二 农杆菌介导的植物遗传转化技术	113
附录	118
附录 1 常见动植物染色体数目	118
附录 2 χ^2 值表	120
附录 3 显微镜的结构和使用方法	122
附录 4 染色体标本制备方法	123
附录 5 实验室一般药液的配制	124
附录 6 染色液的配制	128
附录 7 培养基的配制	130
附录 8 清洗液的配制及玻璃器皿的清洗方法	135
参考文献	136

第1章

遗传的物质基础



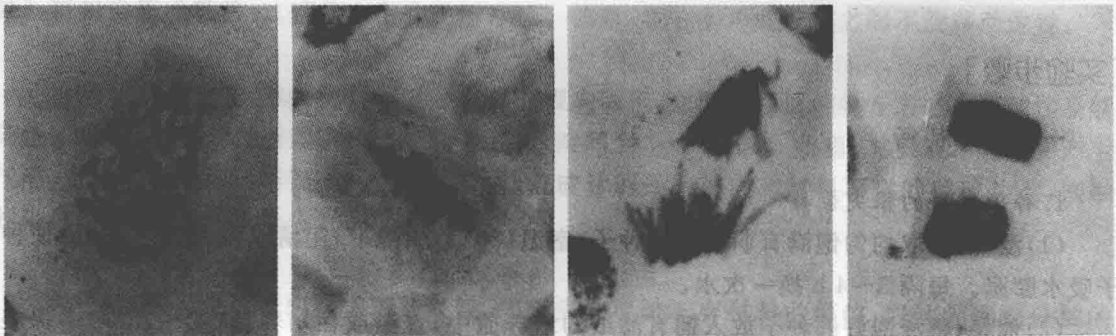
实验一 植物有丝分裂的制片和观察

[实验目的]

掌握植物根尖压片技术；观察植物细胞有丝分裂过程及各时期染色体的形态变化特征；学习染色体计数的方法。

[实验原理]

有丝分裂是体细胞产生体细胞的过程，常见于根尖、芽尖等分生区细胞。一个细胞周期可分为间期和分裂期。分裂期包括前期、中期、后期和末期四个时期。由于各个细胞的分裂是独立进行的，因此，在同一分生组织中可以看到处于不同分裂时期的细胞，同一时间固定后，就可在同一个装片上观察到细胞分裂的各个时期的图像(图 1-1-1)。



前期

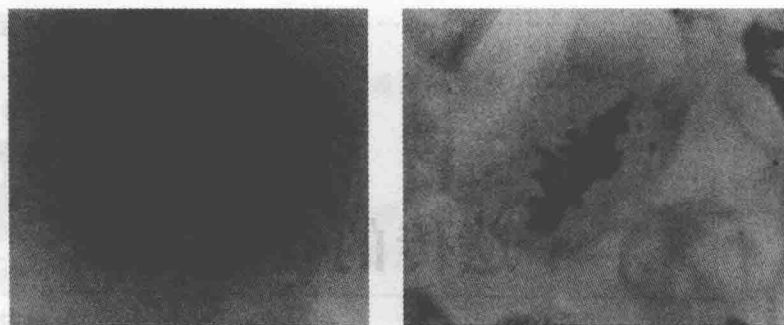
中期

后期

末期

图 1-1-1 黑麦根尖有丝分裂各时期分裂相

植物细胞有丝分裂的常规压片技术是观察植物染色体常用的方法。染色体容易被碱性染料(如碱性品红)着色，通过在显微镜下观察各个时期细胞内染色体的存在状态，就可以判断这些细胞处于有丝分裂的哪个时期，还可以进行染色体计数(图 1-1-2)。植物根尖分生区细胞正处于有丝分裂旺盛期，在这些部位取材制片可以观察到较多的分裂相。



极观

侧观

图 1-1-2 玉米有丝分裂中期

[实验用品]

1. 实验材料

- (1) 黑麦($2n=14$)、玉米($2n=20$)、蚕豆($2n=12$)种子。
- (2) 洋葱($2n=16$)、大蒜($2n=16$)鳞茎。

2. 实验仪器与备品

- (1) 仪器: 培养箱, 恒温水浴锅, 显微镜。
- (2) 备品: 培养皿, 广口瓶, 小烧杯, 称量瓶, 载玻片, 盖玻片, 镊子, 解剖针, 刀片, 胶头玻棒, 滤纸, 铅笔, 橡皮等。

3. 实验药品

卡诺固定液(乙醇/冰醋酸=3/1, V/V), 90%、80%和70%乙醇, 1 mol/L 盐酸, 45%醋酸, 碱性品红染色液。

[实验步骤]

一、材料制备

1. 种子材料的根尖制备

(1) 浸种: 选取均匀饱满有萌发力的种子, 室温(20°C 左右)下, 用清水浸泡 14~18 h, 使种子吸水膨胀。每隔 3~4 h 换一次水。

(2) 催芽: 将浸泡好的种子放入铺有滤纸的培养皿中, 室温或在培养箱($20\sim 25^{\circ}\text{C}$)中保湿培养(种子的上下都要加湿润的滤纸)36 h 左右。每隔 3~4 h 用清水冲洗一次。

(3) 固定: 待根长至 1 cm 左右时, 便可以用卡诺固定液进行固定了。一般在上午 9:00~11:00 固定, 因为这个时间段分生组织细胞分裂旺盛。黑麦材料由于种子较小, 可以将根尖连同种子一起固定, 玉米和蚕豆材料一般是将根尖取下固定。固定液的用量一般应为材料体积的 4 倍以上。室温下固定 1~24 h。

(4) 保存: 将固定材料的固定液倒掉, 依次加入 90%乙醇→80%乙醇→70%乙醇, 进行置换, 每级停留 15~20 min, 最后保存在 70%乙醇中, 放置在阴凉处备用, 也可放入冰箱($0\sim 4^{\circ}\text{C}$)中长期保存。

2. 鳞茎材料的根尖制备

将洋葱、大蒜鳞茎的外层老皮剥去,底部老根去掉(注意不要伤到四周的根芽),置于盛有清水的小烧杯上,底部要与清水接触。每天换水1~2次,以防烂根。室温光照条件下培养2~3 d,待根长至1~3 cm时,于上午9:00~11:00将根尖取下固定。固定和保存的方法同种子材料。

二、解离与软化

1. 解离

植物根尖分生组织的细胞间存在细胞间质,需要用药液进行解离,使组织细胞分开。常用的解离方法有酸解法和酶解法,本实验采用酸解法。下面以黑麦根尖为例叙述解离过程。

取适量的保存于70%乙醇中的黑麦根尖,放入小称量瓶中,加入1 mol/L盐酸,用量以淹没材料为宜,将其放入60℃的恒温水浴锅中(为了避免称量瓶倾倒,可以取一个50 mL的小烧杯,里面加入适量的60℃水浴锅中的水,将称量瓶坐在里面,再将小烧杯放入水浴锅中),解离10~15 min后取出,倒净盐酸酸解液,用水浴锅中的热水冲洗3~5次,每次停留3~5 min。水洗的目的是为了把根尖中的酸液彻底清洗干净,防止解离过度 and 影响制片的着色力。

2. 软化

水洗后,将水倒净,加入45%醋酸继续软化,此时即可开始制片。

三、制片与观察

1. 十字压片

取一粒黑麦种子上的2~3条根尖,用刀片切取根尖前端1~1.5 mm的分生区,放在干净的载玻片的1/3处,另取一干净的载玻片,呈十字形交叉盖在第一片有根尖分生区的位置上,用大拇指按压上层载玻片(也可将两载玻片拿起,使右手拇指在上、食指在下,用力挤压材料处),将根尖压成雾状,这就是十字交叉压片法。注意:压片时两载玻片之间不能移动位置。

2. 染色

将两载玻片分开,此时两张载玻片上都有根尖细胞,立即向有材料处各加一小滴碱性品红染色液,随即加上干净的盖玻片进行染色,染色时间为5~10 min。注意:加盖玻片时不要产生气泡。正确的方法是:用镊子夹住盖玻片,让盖玻片的一边靠在离材料不远的载玻片上,接触到染色液,然后将其徐徐放下。

3. 敲片和压片

染色后,用两层滤纸包在盖玻片位置,用胶头玻棒敲击有材料的部位,以达到细胞分散的目的。敲片后,用拇指从盖玻片上方垫着滤纸用力压下去,这样既可以挤出多余的染色液,又可使细胞压在一个水平面上,便于观察。注意:敲片的力度要掌握好,以防敲碎玻片;敲片和压片时,盖玻片和载玻片之间不能相互移动,否则会将根尖细胞捻变形,导致观察不到分裂相。

4. 镜检和绘图

将制好的装片放在显微镜载物台上,将有材料的部位移入光路,先用10倍物镜调焦,看清细胞,找到分裂相后,再转换成高倍物镜做进一步细致的观察,将比较典型的分裂相绘于实验报告本上。注意:转换成高倍物镜后,只能用微调旋钮,不能用粗调旋钮,以免压碎装片,划伤损坏镜头;要用铅笔绘图,绘图要真实形象,绘临摹图而不是模式图。

本实验的全部操作流程为:选材→浸种→催芽→固定→保存→解离、软化→取根尖分生区→十字压片→染色→加盖玻片→敲片、压片→镜检→绘图。

[注意事项]

1. 不同的材料,解离时间会有所不同,应根据材料的解离程度灵活掌握,一般情况下,在规定的时间内宁长勿短。
2. 解离后,水洗一定要彻底,否则可能会造成染色失败。

[作业及思考]

1. 每人制作两张分裂相清晰的片子,将观察到的有丝分裂的4个时期绘图于实验报告册上,并简要说明染色体的行为特征。
2. 进行染色体计数时,是中期细胞的侧面观还是极面观更方便检测?

实验二 植物减数分裂的制片和观察

[实验目的]

掌握植物花粉母细胞减数分裂涂抹制片技术;观察植物细胞减数分裂全过程及各时期染色体的形态变化特征;学习染色体计数的方法。

[实验原理]

减数分裂是一种特殊的有丝分裂,又称为成熟分裂,是性母细胞产生性细胞的过程。一个性母细胞,染色体复制一次,细胞连续分裂两次,结果产生4个染色体数目减半的子细胞。

用涂抹法制作植物花粉母细胞减数分裂装片技术是最基本的细胞学研究技术,简单易行,效果良好。因此,在检查染色体数目、观察染色体变异及染色体分带技术中被广泛采用。

对于同一朵花中的花药内的花粉母细胞减数分裂几乎是同步的,因此,要观察到减数分裂的各个时期,需要取不同花的花药,做多张装片才能观察全。

[实验用品]

1. 实验材料

(1) 黑麦($2n=14$)幼穗、玉米($2n=20$)雄幼穗。

(2) 大葱($2n=16$)花序。

2. 实验仪器与备品

(1) 仪器:显微镜。

(2) 备品:培养皿,广口瓶,剪刀,镊子,解剖针,刀片,载玻片,盖玻片,滤纸,铅笔,橡皮等。

3. 实验药品

卡诺固定液(乙醇/冰醋酸=3/1,V/V),90%乙醇、80%乙醇和70%乙醇,醋酸洋红染色液。

[实验步骤]

一、材料制备

1. 黑麦幼穗的制备

(1)取材与固定:在黑麦挑旗期,上午9:30~11:30,剪取叶枕距(旗叶叶枕与相邻叶叶枕之间的距离)为0.5~1.0 cm的幼穗,剥去外面的苞叶,立即放入装有卡诺固定液的广口瓶中进行固定。固定液的用量一般应为材料体积的4倍以上。室温下固定1~24 h。

(2)保存:将固定材料的固定液倒掉,依次加入90%乙醇→80%乙醇→70%乙醇,进行置换,每级停留15~20 min,最后保存在70%乙醇中,放置在阴凉处备用,也可放入冰箱(0~4℃)中长期保存。

就一个黑麦幼穗的发育而言,中上部最先发育,向上向下渐晚;一个小穗上的两朵小花的发育也有差异;一朵小花的三枚花药发育时期基本一致。

2. 玉米雄幼穗的制备

(1)取材:在玉米大喇叭口期,上午7:00~9:00,用手由上至下探捏玉米叶鞘,当捏及有松软感时,表明此处即为雄花序所在的位置。用刀片纵向切开叶鞘,取出数条分枝检查,若先端的小分枝长3~4 cm时,即可取材固定。

(2)固定与保存:同黑麦幼穗。

3. 大葱花序的制备

将冬季储藏的大葱于3月移栽盆中,待长出花苞后取材;也可以于3、4月份,从市场买带嫩绿色花苞的大葱取材。选择刚刚抽出葱叶的花苞最为合适。取材时间为上午9:00左右,剥去花苞的外苞被,之后将花序放入卡诺固定液中固定。固定和保存的方法同黑麦幼穗。

二、制片与观察(以黑麦为例)

1. 取花药

取保存于70%乙醇中的黑麦幼穗,置于培养皿中。用镊子从幼穗上取一朵小花(记住该小花在幼穗上的位置),放在干净的载玻片上,用镊子和解剖针剥出小花中的三枚花药,置于载玻片的1/3处。

2. 染色

在花药处加一滴醋酸洋红染色液,用刀片或解剖针将花药横向切断,再用解剖针或镊子轻轻挤压花药,使其内部的花粉母细胞被挤压到染色液中。然后用镊子捡出肉眼可见的花药壁残渣,盖上干净的盖玻片,染色5 min左右。盖玻片的正确盖法见实验一。

3. 初步镜检

将上述玻片置于低倍镜(一般用10倍物镜)下,寻找花粉母细胞,观察是否有分裂相。视野中可能会看到几种细胞:①花粉母细胞,即目标细胞,又圆又大,处于分裂期时可看见染色很深的染色体;②花药壁细胞,未洗净的花药壁残渣,细胞小且连成片状,细胞核也很小;③绒毡层细胞,即花药壁内侧的体细胞,较小,呈不规则多边形,且有2个较大的细胞核;④小孢子,较小,呈扇形或卵形,是减数分裂结束后四分体脱开形成的。

若观察到分裂期的花粉母细胞后,可以进行下一步处理,否则,要以本次取小花的位置为参考,选取合适的小花重新制片。

4. 压片

将有分裂相的玻片包被滤纸后,用右手拇指从盖玻片处匀力压下去,一次即可。压片的目的是为了挤出多余的染色液,之二是把细胞压扁在一个平面上,使染色体分散开来,便于观察。注意:压片时,载玻片和盖玻片之间千万不要相互移位,否则会使细胞错位变形,导致无法观察。

5. 再镜检和绘图

将制好的装片放在显微镜载物台上,先用10倍物镜调焦,看清细胞,找到分裂相后,再转换成高倍物镜做进一步细致的观察,并将典型的分裂相绘于实验报告册上。注意:显微镜的使用和绘图要求同实验一;观察时注意区分花粉母细胞、花药壁细胞、绒毡层细胞和单核花粉粒(图1-2-1、图1-2-2)。

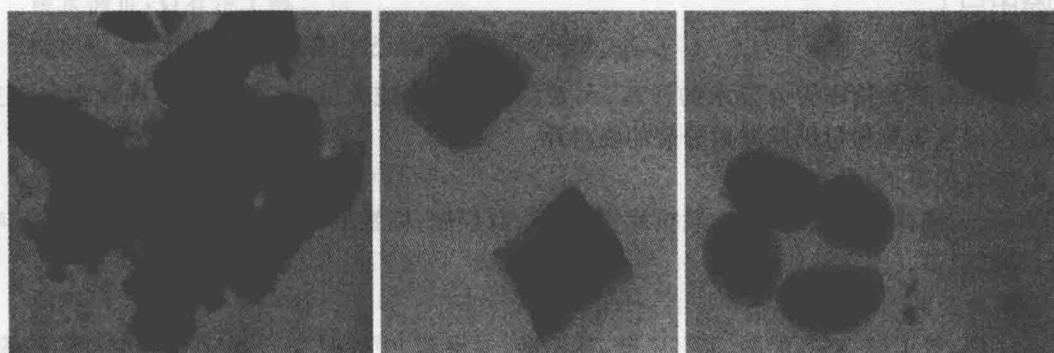


图 1-2-1 黑麦花粉母细胞减数分裂

本实验的全部操作流程为:取材→固定→保存→取花药→染色→横断挤压花药→检出残渣→加盖玻片→初镜检→压片→再镜检→绘图。

[注意事项]

1. 压片不得用力过猛,以免将细胞压碎。
2. 染色液不宜多用,否则压片时,花粉母细胞会随着染色液被压到盖玻片外。
3. 注意区分花粉母细胞、绒毡层细胞及单核花粉粒。花粉母细胞为圆球状、核大、着色浅、单核;绒毡层细胞为多边形、双核、核小且染色深;单核花粉粒为长圆形、体积远比花粉母细胞小。
4. 注意区分中期 I 和中期 II、后期 I 和后期 II,第一次分裂是在圆球状细胞中进行,第二次分裂是在两个半月形细胞中进行。



花药壁细胞

绒毡层细胞

小孢子 (单核花粉)

图 1-2-2 黑麦花粉母细胞减数分裂制片视野中其他细胞形态

[作业及思考]

1. 每人制作 3~4 张分裂相清晰的片子,将观察到的减数分裂的典型分裂相绘于实验报告本上,并简要说明染色体的行为特征。
2. 减数分裂的哪个时期是进行染色体计数的最佳时期?

实验三 永久片制作

[实验目的]

了解临时片制作为永久片的原理,掌握永久片制作的方法,掌握不同制作方法脱水剂的配制和应用。

[实验原理]

用植物根尖细胞压片法或花粉母细胞涂抹法制成的临时片,若材料染色清晰、分裂相符合要求,一般可用石蜡、甘油胶冻或指甲油将盖玻片的四周封固,在冰箱中可保存一周左右。但时间过长,物像收缩,颜色变浅,难以观察鉴别。因此,对一些效果好的片子要长期保存,就必须改制为永久片,以便进一步观察和研究。

永久片的制作程序包括脱去临时片的盖玻片、材料脱水、透明和封片。

压片法或涂抹法制成的临时片,材料中含有较多的水分,放置时间长了,水分蒸发,材料颜色变深后无法鉴别。因此清除制作过程中的水分及材料中的水分,防止材料变质是至关重要的。其中材料脱水干净和透明良好是制好永久片的关键。因此需要用适当的脱水剂和透明剂。目前较理想的脱水剂有正丁醇和叔丁醇,它们都能与最常用的脱水剂乙醇混合使用,并具有良好的透明效果,且能与封藏剂树脂混合,有利于封片,材料也不会发生收缩和硬化等问题。另外,还有烘片法和冰冻法去除临时片里的水分。透明剂有二甲苯、正丁醇、甲苯、氯仿、丁香油等。好的封片剂要求折光率与玻璃折光率相似,观察时材料不至于变形。加拿大树胶是一种中性树脂,它的折光率与玻璃的折光率十分相近,因此它是普遍应用的一种封片剂。