

经济林遗传育种学 实验实习指导

沈宝莲 段安安 编写

西南林学院遗传育种教研室

一九九七年七月

实 验 实 习 规 则

实验实习是教学的重要环节，是培养学生动手能力的必要措施。
为确保实验实习的顺利进行，以下规则，请大家共同遵守。

- 一、不得无故迟到、缺席、早退。
- 二、保持安静，精心操作，认真实习。
- 三、讲究卫生。严禁吸烟。药品废物不乱丢乱倒。
- 四、注意节约。不随意浪费药品及试材。
- 五、爱护公物，使用仪器，用前检查，用后归还。用完的玻璃器皿应及时清洗。
- 六、注意安全。使用电器要特别小心谨慎，离开实验室（场）要关好电闸、水喉、门窗。

目 录

实验一	细胞减数分裂及制片方法.....	1
实验二	树木染色体组型分析法.....	3
实验三	数量性状的遗传参数——遗传力估计.....	6
实验四	自然类型的划分及评定.....	10
实验五	经济林经济性状的相 关分析.....	15
实验六	优树选择.....	19
实验七	经济林有性杂交技术.....	24
实验八	花粉贮藏及生命力测定.....	27
实验九	植物多倍体的诱变与鉴定.....	31
实验十	优树自由授粉子代的苗期测定.....	36
实验十一	双列交配设计.....	41
实验十二	双列交配设计的统计分析.....	44
实验十三	芽苗砧嫁接技术.....	49
实验十四	用材林优树选择的方法.....	52
实验十五	桃品种间果实性状测定及分析	
实验十六	桃园和李园参观调查实习	
实验十七	育种参观实习	
实验十八	林木育种常用田间试验设计的统计分析	

实验一 细胞减数分裂及制片方法

一、实验目的

掌握花粉母细胞染色体的压片镜检技术；熟悉花粉母细胞减数分裂各个时期的主要特征及染色体行为。

二、原理

这是性母细胞成熟时，产生配子过程中所发生的一种特殊的有丝分裂。分裂时，体细胞染色体 $2n$ ，经过减数分裂后形成的性母细胞只有原来染色体数的一半 ($\frac{2n}{2}$) 即为 n 。随后，又通过精细胞和卵细胞的受精形成合子，又恢复体细胞的正常染色体数目，即 $2n$ ，从而保证了物种染色体的恒定性。据此，在细胞减数分裂的适当时机，采集植物的花蕾，经固定后进行压片、染色，就可以在显微镜下观察到小孢子母细胞形成花粉粒时的减数分裂过程。

三、材料器材及试剂

(一) 材料：用已固定的正处于减数分裂时期具有不同形态指标的板栗、油茶、苹果、柑桔的花芽或花蕾；玉米的雄花或蚕豆、豌豆的花蕾。

(二) 器材：显微镜、解剖针、解剖镊子、载玻片、盖玻片、试剂瓶、酒精灯、吸水纸、记录本等。

(三) 药品：卡诺固定液、醋酸洋红、树胶等。

四、实验步骤

(一) 取样。植物花粉母细胞减数分裂时期，与某些外部形态有一定的相关性，故可按有关的形态指标来判断植物花粉母细胞所处的分裂时期，并以此作为取样依据。

1、柑桔 一般在花蕾直径长到4毫米左右时取样固定为宜。

2、玉米 在喇叭口时期，用刀片纵向切开叶鞘取出雄花。此时雄花分枝先端的小穗长度为3~4毫米，可透过颖片看到小花里的花药为白色，于上午7~9时取样固定。

(一) 固定 作用在于尽快地杀死细胞，使细胞结构尽可能保持接近于活的状态。

1、固定方法 将选取的材料立即投入卡诺固定液（无水乙醇3份，冰醋酸1份）中固定2~4小时后取出作保存处理；

2、材料保存 经固定的材料若需保存，可用梯度酒精法浸洗（用95%、85%、70%的酒精各浸洗一次，每次10分钟），然后将其保存在70%的酒精中并置于0~5℃的冰箱中备用。

(二) 制片 以玉米雄花为材料

先将雄穗分枝置于培养皿内，随即用解剖针从适当大小的小花内挑出花药2个，置于吸水纸上，除去酒精后再置于载玻片上加一滴醋酸洋红（或改良品红）持针横切花药，再用针尖轻压，挤出花粉母细胞，尽量挤净，然后除去花药及渣子，微微捣开成堆的花粉母细胞再置于低倍镜下观察所需要的分离相。

(四) 分 色

当染色过深时，可用45%的醋酸退色。

(五) 封 片

制好的片子需长期保存，可将片子立即放入冰箱结冰层，待结冰后，用刀片揭开盖片，空气中干燥3~4天，用中性树脂胶封片。

五、作业

1、根据实验提供的试材，每人绘制一张在减数分裂时期所看

到的分裂简图。并阐述其是减数分裂的哪一期？

2. 概述减数分裂在遗传育种中的意义？

实验二 树木染色体组型(核型)分析

一. 实验目的

植物染色体组型分析(又称为核型分析, Karyotype Analysis)是细胞遗传学研究的基本方法之一. 这对于物种的起源和进化, 染色体的形态特征, 结构变异和数量变异, 识别和鉴定染色体等都具有重要意义. 一般通过有丝分裂和减数分裂均可进行核型分析. 本此实验主要目的是掌握树木有丝分裂的染色体组型(核型)分析的基本方法, 掌握计算染色体的绝对长度, 相对长度和臂比的方法.

二. 实验用具

小尺或三角板, 剪刀, 镊子, 铅笔, 胶水, 绘图纸, 计算器.

三. 试验材料

油松(*Pinus tabulaeformis* Carr.)根尖分生组织有丝分裂的染色体照片.

四. 实验内容和步骤

1. 观察染色体数目

$2n =$ (条)

2. 观察染色体形态

着丝点的位置, 随体的数目, 形状和大小, 次缢痕的有无和位置.

3. 测量染色体长度并计算

A. 绝对长度(以毫米(mm)计算)

首先必须判断着丝点(主缢痕)的位置, 分别测量长臂和短臂. 染色体长度(mm),

即总长=长臂+短臂

B. 相对长度(有几种表示方法)

1). 每一染色体的绝对长度占全部染色体长度的百分率;

2). 每一染色体的绝对长度占染色体组 (genome) 中最长的与最短的染色体长度之和的百分率;

3). 每条染色体的绝对长度与染色体组的总长度之百分率;

本此实验采用第一种相对长度计算方法.

C. 染色体长度变异系数 $CV = \text{标准差} / \text{染色体平均长度值}$;

D. 臂比: 长臂长度 / 短臂长度;

E. 染色体分类: 以臂比值确定着丝点位置, 并据此进行分类如下:

类 型	表示符号	臂 比 值
中 部 着 丝 点 染 色 体	(m)	1.0-1.7
近中部着丝点染色体	(sm)	1.7-3.0
近端部着丝点染色体	(st)	3.0-7.0
端 部 着 丝 点 染 色 体	(s)	7.0以上

4. 配对: 根据目测和每个染色体的总长度, 两臂长度, 臂比, 次缢痕的有无和位置, 随体的有无, 形状和大小, 进行同源染色体的剪贴配对.

5. 排列: 染色体通常是从大到小, 按长度顺序编号. 等长的染色体, 臂比值小者在前.

五. 实验报告:

1. 完成下表:

染色体形态观察测量记录表

编号	绝对长度	相对长度	长臂	短臂	臂比	随体	次缢痕	类型	备注

2. 染色体组型剪贴配对排列图:

3. 染色体模式图:

4. 染色体数量和长度变异系数: $2n =$ $C.V. =$

实验三 数量性状的遗传参数——遗传力的估计

群体某一数量性状的遗传方差与总的表型方差之比率，称之为该性状的遗传力 (Heritability)，记为 H^2 。其是衡量性状遗传能力大小的指标，以%表示，数值在0~1之间。

遗传力在经济林育种中，是评价选种效果，确定选择方式，估计现有性状的育种值等方面的一种参考数值或统计常数，故又将其称之为遗传参数。

根据研究性状遗传变异的性质，及为适应各种育种方案的需要，又将遗传力分为三种类型：

$$1、\text{广义遗传力 } h_B^2 (\%) = \frac{\text{基因型方差}}{\text{表型方差}} \times 100 = \frac{V_G}{V_P} \times 100$$

$$2、\text{狭义遗传力 } h_N^2 (\%) = \frac{\text{加性遗传方差}}{\text{表型方差}} \times 100 = \frac{V_D}{V_P} \times 100$$

$$3、\text{现实遗传力 } h_R^2 = \frac{\text{预期遗传进展}}{\text{选择差}} \times \frac{G_s}{i} \times \frac{G_s}{k\sigma_P}$$

测定遗传力的基本方法，可分为亲子代相关（或回归）和同胞相关两大类。在经济林育种工作中以利用基因型一致的无性系，估算出环境方差近似值，再求出广义遗传力 (H^2)；利用方差分析法估算遗传力 (H^2)；利用亲子代回归，估算遗传力 (h^2) 等几种方法应用最为普遍。

本次实验主要是使学生掌握如何利用方差分析法对遗传力 (H^2)

进行估算的方法步骤。

一、估测原理

应用方差分析的期望均方，分离和估算各方差的组成部份，进而估算遗传力。现将单因素设计的分析方法及原理简述于下。

设有 n 个品种，重复 r 次。则试验有 $n r$ 个小区。按一般单因素分析法，可得下列方差分析表：

表 1 单因素方差分析表

项 目	D f	S S	M S	E M S
重 复	(r - 1)	S S _r	M _r	
处 理	(n - 1)	S S _v	M ₁	$\sigma_e^2 + \sigma_v^2$
误 差	(r - 1) (n - 1)	S S _e	M ₂	σ_e^2
总 计	n r - 1	S S _t		

$$V_G = \sigma_v^2 = \frac{(M_1 - M_2)}{r}$$

$$V_E = \sigma_e^2$$

$$V_p = V_G + V_E = \frac{1}{r} [M_1 + (r - 1) M_2]$$

$$h_B^2(\%) = \frac{V_G}{V_p} \times 100 = \frac{M_1 - M_2}{M_1 + (r - 1) M_2} \times 100$$

二、计算步骤

1、列出性状测量数据

2、利用性状数据分别求出重复、处理及误差项的Df, SS, MS并列出方差分析表;

3、将方差表中的 M_1 、 M_2 等数值代入 $h^2_B(\%) = \frac{V_G}{V_p}$
 $\times 100 = \frac{M_1 - M_2}{M_1 + (r-1)M_2} \times 100$, 求得广义遗传力
 h^2_B 。

三、资料来源

利用云南省林科院广南油茶研究站1982年在宜良花园林场采取随机区组三重复设计对25株油茶优树自由授粉子代所进行的苗期苗高的调查资料(见表2)。

四、作业

1、利用表2资料,采用方差分析法,对油茶苗高这一性状的广义遗传力进行估算。

2、通过对油茶苗高遗传力的估测,你认为其对油茶育种有何指导意义?

表2 2.5株油茶优树自由授粉子代苗高资料(厘米)

区 组 树 号	I	II	III	备 注
209号	16.4	17.5	18.2	
261	20.6	26.4	15.8	
293	13.8	17.4	14.8	
292	9.2	15.4	18.0	
295	11.0	29.8	19.6	
285	21.6	29.3	22.6	
14	18.0	17.8	19.6	
99	17.4	19.4	14.6	
218	10.6	8.8	20.2	
37	24.0	18.6	21.2	
27	14.0	23.6	25.8	
72	17.8	24.0	16.2	
197	20.3	26.6	26.6	
270	17.6	18.8	10.2	
13	19.6	39.5	34.8	
309	25.4	20.0	21.2	
65	16.8	31.6	14.4	
119	24.2	22.4	21.0	
286	14.1	20.0	18.2	
272	18.6	15.4	21.0	
2505	22.8	19.2	22.0	
25012	14.6	15.4	12.8	
2501	15.4	25.4	23.6	
2209	14.0	23.0	21.0	
CK	20.0	18.4	14.0	

实验四 自然类型的划分及评定

一、目的要求

通过实习，使同学掌握经济林树种种内的变异及自然类型划分评定的方法步骤。

二、原理

在同种生物世代之间或同代不同个体之间，由于杂交和自然选择出现了在形态生理和生态上有一定差异的群体或个体。在形态上不同的叫形态型，在物候上不同的叫物候型，在生态上不同的叫生态型。实践中，人为地对形态、生理、生态上的变异类型进行划分，再根据经济性状的评定，从中评选出优良类型提供于生产，称类型选择。

三、材料与用具

(一) 材料 板栗、八角、油茶等人工实生成林 5~10 亩；

(二) 器具 油标卡尺、钢卷尺、红油漆、毛笔、纸牌、药物天秤、索氏油脂抽提器等。

四、划分类型的标准，以油茶为试材。

(一) 按物候期进行划分

1. 按开花期

(1) 早花类型——在整个林分中，一些油茶的盛花期（50%的花蕾也已开放），比其它油茶的盛花期早 15~30 天；

(2) 晚花类型——在整个林分中，最后才步入盛花期的单株，可划分为晚花类型；

(3) 中花类型——在早与晚花类型间开放的可划分为中花类型。

2. 按果实成熟期

(1) 寒露子——于寒露节令前成熟(单株果实10%左右自然开裂,种子发黑);

(2) 霜降子——于霜降节令(10月23日)前后成熟;

(3) 交冬子——于立冬节令(11月7日)前后成熟;

3、按树形进行划分

(1) 开张型——分枝矮,分枝角度大,树冠呈伞形;

(2) 直立型——分枝高,分枝角度小,主干明显,树冠呈塔形上冲。

4、按果形果色进行划分

(1) 按果色——以成熟果实为标准,可分为红、黄、绿三色。

(2) 按果形——可划分为球形、桃形、皱顶、桔形、橄榄形等。

五、类型选择的方法

(一) 设置标准地。采取典型抽样方法,选择代表性强的林地2~3亩作为标准地;

(二) 每木调查。将标准地内林木进行每木编号,然后行每木调查,结果填入表1。

表1 油茶自然类型调查表

株号	树高	冠 幅		地 径	分枝高	果 形	果 色	物 候 期	
		东 西	南 北					花 期	果熟期

(三) 经济性状评定。将划分出的类型的有关性状，特别是经济性状进行实测评定。根据评定结果，可初步选出较优类型推广于生产。经济性状评定结果填入表3。

六、作业

1、在该标准地内，依据树形、果形果色、物候可将普通油茶划分为几个自然类型？各自然类型在林分中的比例如何？

2、对所划分的自然类型进行描述？

3、对所划分的自然类型作经济性状测定及评价。

4、你认为除上述类型外，还可根据某些性状再划分出几种类型来？

见表3

自然类型

[illegible]

