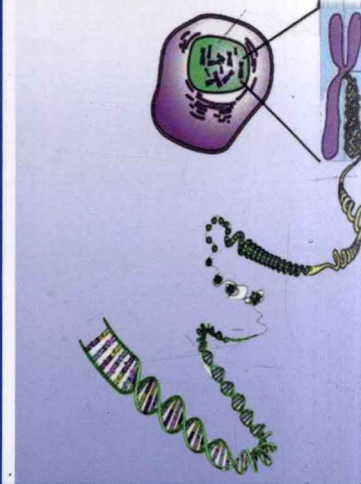


水产科学实验教材

水产生物



遗传育种学实验

GENETICS AND BREEDING
EXPERIMENTS OF AQUATIC LIFE

郑小东 孔令锋 汤志宏 李琪 于瑞海 编

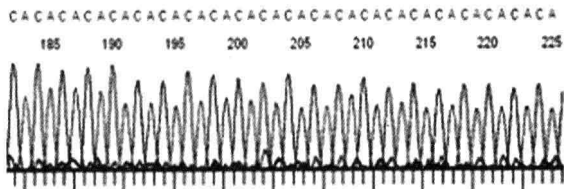


中国海洋大学出版社
CHINA OCEAN UNIVERSITY PRESS

中国海洋大学教材建设基金资助

水产生物遗传育种学实验

郑小东 孔令锋 汤志宏 李 琪 于瑞海 编



中国海洋大学出版社
青岛

图书在版编目(CIP)数据

水产动物遗传育种学实验 / 郑小东等编. —青岛:
中国海洋大学出版社, 2012.9
ISBN 978-7-5670-0076-6

I. ①水… II. ①郑… III. ①水生动物—遗传育种—
实验 IV. ①S917.4—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 214918 号

出版发行 中国海洋大学出版社
社 址 青岛市香港东路 23 号
出 版 人 杨立敏
网 址 <http://www.ouc-press.com>
电子信箱 oucpress@sohu.com
订购电话 0532—82032573(传真)
责任编辑 李建筑
印 制 日照报业印刷有限公司
版 次 2012 年 9 月第 1 版
印 次 2012 年 9 月第 1 次印刷
成品尺寸 170 mm×230 mm
印 张 8
字 数 148 千字
定 价 18.00 元

邮政编码 266071

电 话 0532—85902349

编委会

| | | | |
|-----|-----|-----|-----|
| 主 编 | 温海深 | | |
| 副主编 | 王昭萍 | 唐衍力 | |
| 编 委 | 温海深 | 王昭萍 | 唐衍力 |
| | 张文兵 | 曾晓起 | 马 琳 |
| | 于瑞海 | | |

前 言

水产生物遗传育种学实验是遗传育种学课程的重要组成部分。学生通过自己动手进行实际操作,加深对理论知识的理解,掌握有关的实验技术,培养严谨的科学作风和实事求是的工作态度,以及善于动脑、动手和综合分析能力。

本实验指导书是根据中国海洋大学水产养殖专业最新教学计划和课程大纲编写的,共分为基础性实验、综合性实验、创新性实验和实验设计等三部分,涵盖了经典遗传学实验、细胞遗传学实验、分子遗传学实验和育种学实验设计等,实验内容由浅至深,易于理解和掌握。随着学校不断加大实验教学的建设力度,有关水产育种的实验项目和相关讲义部分得以充实和更新。

在本教材编写过程中,王志刚老师给予了热忱的帮助,在此谨表衷心谢意。

由于水平有限,书中说明不清楚,解释不详细以及错误之处在所难免,希望读者能提出宝贵意见,以便加以修改。

编 者

2012年6月于青岛



目 录

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| 实验实施细则 | 1 |
| 第一部分 基础性实验 | 3 |
| 实验一 有丝分裂过程中的染色体行为观察 | 5 |
| 实验二 减数分裂过程中的染色体行为观察 | 9 |
| 实验三 染色体组型分析 | 14 |
| 实验四 植物多倍体的诱发 | 20 |
| 实验五 人类细胞 Barr 氏小体的观察 | 24 |
| 实验六 果蝇的形态、生活史、培养及杂交方法 | 27 |
| 实验七 果蝇的伴性遗传实验 | 32 |
| 实验八 果蝇的自由组合实验 | 37 |
| 实验九 果蝇的三点测交与遗传作图 | 39 |
| 实验十 果蝇的唾腺染色体 | 44 |
| 实验十一 着丝粒作图:粗糙链孢霉的分离和交换 | 50 |
| 第二部分 综合性实验 | 55 |
| 实验十二 海产贝类染色体核型分析 | 59 |
| 实验十三 牡蛎染色体带型分析 | 63 |
| 实验十四 贝类多倍体诱导和倍性检测 | 69 |
| 实验十五 水产动物同工酶检测 | 71 |
| 实验十六 水产动物细胞 DNA 相对含量测定 | 76 |
| 实验十七 水产动物基因组总 DNA 的提取 | 79 |
| 第三部分 创新性实验和实验设计 | 83 |
| 实验十八 水产动物随机扩增多态性(RAPD)检测 | 85 |
| 实验十九 水生动物的扩增片段长度多态性(AFLP)分析 | 88 |
| 实验二十 水生生物遗传多样性的微卫星标记分析 | 94 |



| | |
|------------------------------|-----|
| 实验二十一 选择育种计划的制订 | 99 |
| 实验二十二 杂交育种计划的制订 | 102 |
| 实验二十三 多倍体育种计划的制订 | 105 |
| 附 录 | 109 |
| 附录 1 果蝇中常见突变性状及控制性状的基因 | 111 |
| 附录 2 果蝇培养基的几种配方 | 112 |
| 附录 3 χ^2 表 | 113 |
| 附录 4 染色液配方 | 114 |
| 附录 5 同工酶试验部分常用试剂配方 | 115 |
| 附录 6 分子遗传学部分常用试剂配方 | 116 |
| 参考文献 | 121 |



实验实施细则

从事实验者必须认真阅读本实验实施细则,详细了解实验前后及其过程的知识 and 应遵守的规则。

一、开设实验的目的

- (1) 掌握遗传育种学的基本实验方法和技能。
- (2) 通过实验验证,巩固理论课所学的基本理论和基础知识。
- (3) 培养学生的观察、分析和动手能力,使其在实验态度、科研能力等方面获得初步训练。

二、实验过程中应注意的问题

(1) 实验用的材料应注意其性质和状态。如果是活体的,应保持其状态(实验前);如果是浸制的或固定的,应先用清水冲洗,以避免药品刺激,影响实验。冲洗时,不可水流过急,以免损坏材料的内外器官或组织。使用和观察标本时,要耐心、仔细。

(2) 要认真使用实验仪器,爱护实验材料。若有浪费标本或损坏、丢失仪器等情形,视情节赔偿。

(3) 实验过程中将手机关闭或处于静音状态,保持室内安静。

三、实验规则

(1) 不迟到,不早退。实验过程保持室内清洁、整齐、有条理。

(2) 爱惜仪器、标本,节约实验材料、药品和试剂。实验结束时,显微镜、体视镜要恢复原位。所用器材必须洗净、擦干,放回原处。

(3) 不得损坏、遗失标本和仪器设备。若有损坏,应及时报告指导教师,以便采取措施,妥善处理。

(4) 不得自行拆看仪器。若发现仪器失灵,应及时通知指导教师,检查并予以处理。

(5) 所用药品严格按照说明书安全使用,有毒药品应在教师指导下使用。



(6) 各实验小组间不得擅自挪用或借用实验器材和药品。

(7) 将用完的不能回收利用的实验材料或试剂等弃入废物器内;有毒试剂需要回收,不能随意倒入下水道中。

(8) 实验结束后,轮流打扫卫生,擦洗实验台及地板。

四、实验指导及实验报告撰写

(1) 做好实验预习,认真阅读实验指导,结合课堂的理论讲授,了解实验目的和内容要求。

(2) 每次实验前,指导教师作讲解和说明。

(3) 实验过程中,应按实验指导进行。不清楚的地方,及时和指导教师沟通交流。

(4) 实验报告包括绘图和答题两部分。字迹要清楚工整,内容要明晰、有条理。

(5) 实验报告中生物绘图的要求。

① 具有高度科学性,形态结构要清晰、准确,充分体现真实性。

② 图面整洁,铅笔要用 2H 或 3H 型号,保持笔尖锐利。

③ 绘图比例要正确,位图位于报告纸的稍左边,右边留空白作注字用。

④ 绘图的线条要光滑、流畅、匀称,打点要大小一致,不可涂色。

⑤ 每图必须有图注,字体用正楷,大小要均匀,不能潦草。注图线用直尺画出,间隔要均匀,且一般多向右边引出,图注部分接近时可用折线,但注图线之间不能交叉,图注要尽量排列整齐。

⑥ 绘图完成后,在绘图纸上方要写明实验名称、班级、姓名、时间,在图的下方注明图名及放大倍数。


(6) 绘图步骤和注意事项。

① 绘图前,应根据实验所要求的绘图数量和内容,在图纸上安排好各图的位置、比例,并留出书写图注的地方,以免由于图设计的不合适而造成排列混乱,影响图的效果和美观。

② 绘图时,先绘整体图,再绘具体结构图,例如细胞结构图,应画出细胞全形,然后再绘细胞各部分结构。

③ 先画草图,再绘详图。先在图纸上轻轻勾出图形的轮廓,并注意对照观察所画轮廓大小是否与实物相符合,然后再用 2H 或 3H 铅笔,描出与物体相吻合的线条。线条粗细均匀,光滑清晰,接头处无叉和痕迹,点要匀称,切忌点线重复描绘。

(7) 实验报告按时完成上交,也可在下次实验课前提交。



第一部分
基础性实验



实验一 有丝分裂过程中的染色体行为观察

一、实验目的

- (1) 学习和掌握染色体压片技术。
- (2) 观察植物根尖细胞有丝分裂各个时期染色体的形态特征和动态变化。

二、实验原理

细胞分裂是生物个体生长和生命延续的基本特征,其中有丝分裂是生物体细胞增殖的主要方式。在有丝分裂过程中,细胞核内染色体能准确地复制,并能有规律地、均匀地分配到两个子细胞中去,使子细胞的遗传组成与母细胞完全一样,从而可以推断生物性状的遗传与染色体的准确复制和均等分配有关。支配生物性状的遗传物质主要存在于细胞核内的染色体上。

细胞有丝分裂是一个连续过程,可分为前期、中期、后期和末期。有丝分裂在整个细胞周期中约占 10% 的时间,而细胞周期其余大部分时间是处于连续两次分裂的细胞间期。有丝分裂的各时期染色体变化的特征简述如下:

前期:核内染色体逐渐浓缩为细长而卷曲的染色体,每一染色体含有两个染色单体,它们具有一个共同的着丝点;核仁和核膜逐渐模糊不明显。

中期:核仁和核膜逐渐消失,染色体缩短变粗,各染色体排列在赤道板上。从两极出现纺锤丝,分别与各染色体的着丝粒相连,形成纺锤体。中期染色体呈分散状态,便于鉴别染色体的形态和数目。

后期:各染色体着丝点处分裂为二,连接的两个染色单体也相应分开,成为两个染色体,并各自随着纺锤丝的收缩而移向两极,每组有一套染色体,其数目和原来的染色体数目相同。

末期:分开在两极的染色体各自组成新的细胞核,在细胞质两极赤道板处形成新的细胞壁,使细胞分裂为二,形成两个子细胞。这时细胞进入分裂间期。

间期:细胞分裂末期到下一次细胞分裂前期间的一段时间。在光学显微镜下,看不到染色体,只能看到均匀一致的细胞核及其中许多的染色质。实际上,



此时核处于高度活跃的生理生化的代谢阶段,为细胞继续分裂准备条件。

高等植物有丝分裂主要发生在根尖、茎生长点及幼叶等部位的分生组织。由于根尖取材容易,操作和鉴定方便,故一般采用根尖作为观察有丝分裂的适宜材料。

三、实验材料

洋葱(*Allium cepa*, $2n=16$)的鳞茎,蚕豆(*Vicia faba*, $2n=12$)的种子。

四、实验用具和试剂

1. 仪器用具

显微镜,乙醇灯,恒温箱,水浴锅,培养皿,载玻片,盖玻片,镊子,刀片,解剖针,木夹,吸水纸,滤纸,标签,铅笔等。

2. 药品试剂

无水乙醇,95%乙醇,80%乙醇,70%乙醇,1 M 盐酸,醋酸洋红,卡诺氏(Carnoy's)固定液,氢氧化铁,秋水仙素。

3. 试剂制备

醋酸洋红染色液:将 45 mL 醋酸加入到 55 mL 蒸馏水中,加入洋红 1 g,煮沸,使其充分饱和,冷却过滤,并加醋酸铁或氢氧化铁(媒染剂)水溶液数滴或在加入 1 g 洋红的同时加入 1 枚大头针,煮沸,然后文火 2~3 h,冷却过滤。

改良苯酚品红染液:将 3 g 碱性品红溶于 100 mL 70%酒精,取其中 10 mL 加入到 90 mL 5%苯酚水溶液中,搅拌均匀。从中取 55 mL 溶液加入到 6 mL 的冰醋酸和 6 mL 的 38%的甲醛中。取混合液 20 mL,加 45%冰醋酸 80 mL,充分混匀,再加入 1 g 山梨醇,放置 14 d 后使用,可保存 3 年。

卡诺氏(Carnoy's)固定液:

配方 I:纯酒精 3 份+冰醋酸 1 份。

配方 II:纯酒精 6 份+冰醋酸 1 份+氯仿 3 份。

也可用甲醇和冰醋酸 3:1 混合。该固定液是研究细胞分裂和染色体的优良固定液,使用时需要现用现配,长时间放置会影响固定效果,固定时间不宜过久。必要时可以调整酒精(或甲醇)与冰醋酸之间的比例。增加冰醋酸量,有助于细胞膨胀,染色体舒展,但是也容易导致细胞破裂和染色体散失。

五、实验步骤

1. 材料准备

选取新鲜饱满的蚕豆种子,加少量热水(90℃左右)搅拌 1~2 min,倒入冷



水调节温度,使其达 $45^{\circ}\text{C}\sim 50^{\circ}\text{C}$,放置过夜,使种子充分吸水膨胀。然后,将水倒出,用蒸馏水清洗,捞出后,包于干净的双层湿纱布中,置于 25°C 培养箱中。待种子开始萌发时取出,使胚根外露出向下插入经水洗过的湿锯末中,锯末厚度 $3\sim 5\text{ cm}$,保持温湿条件继续培养。当胚根长到 $1.5\sim 2.0\text{ cm}$ 时,切除主根根尖,继续埋入湿锯末中,使其生出侧根。当侧根长至 1.5 cm 左右时,用水洗净根系,用吸水纸尽量吸干种子及胚根上的水分。将长出侧根的蚕豆置于 0.1% 秋水仙素溶液(量以浸没根尖为宜),保存在 8°C 培养箱中(这样处理,可抑制和破坏纺锤丝的形成,促使染色体缩短和分散)。然后,用刀片或剪刀将上述处理的根尖剪下 1 cm 左右,以卡诺固定液在室温条件下固定 $2\sim 24\text{ h}$,固定液用量为根尖材料体积的 15 倍以上。固定完成后,用 95% 乙醇冲洗根尖后,置于 70% 乙醇中。在 $0^{\circ}\text{C}\sim 4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中可保存 $1\sim 2$ 年。

2. 染色体标本的制作

将数根根尖放入盛有醋酸洋红染色液(5 mL)的小指管中,用木夹夹住,在乙醇灯上加热煮沸,稍离火,再烧沸,重复 $7\sim 8$ 次,使根尖软化着色。加热时,要先预热并不断摇动试管,以防煮沸的染色液冲出试管。然后将处理过的根尖倒入表面皿中,取根尖,置于载玻片上,切取根尖分生组织约 1.5 mm ,加 1 滴醋酸洋红,盖上盖玻片,包被吸水纸吸干多余染色液,用手指轻压,再用带皮头的玻璃棒垂直轻敲。注意:敲打时,不要移动盖玻片。

3. 镜检

先用低倍显微镜寻找有分裂相的细胞,随机统计 100 个细胞,确定处于不同分裂时期的细胞的百分率,然后再用高倍镜仔细观察各时期染色体的行为和特征。

六、作业

- (1) 制作细胞有丝分裂各时期图像清晰的片子 $1\sim 2$ 张。
- (2) 对所观察到的有丝分裂各时期细胞分裂相进行绘图,并简要说明染色体的行为特征。

七、分裂相(参考)

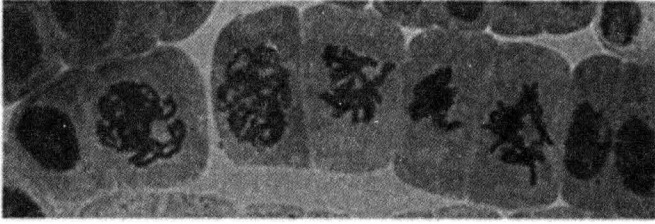


图 1.1 蚕豆有丝分裂相

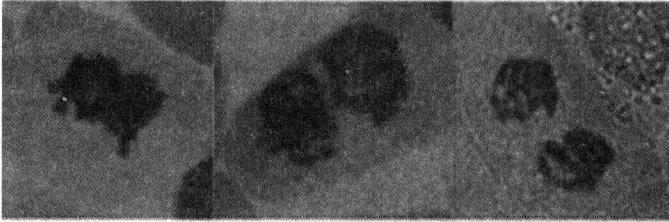


图 1.2 蚕豆有丝分裂相(示分裂中、后期)

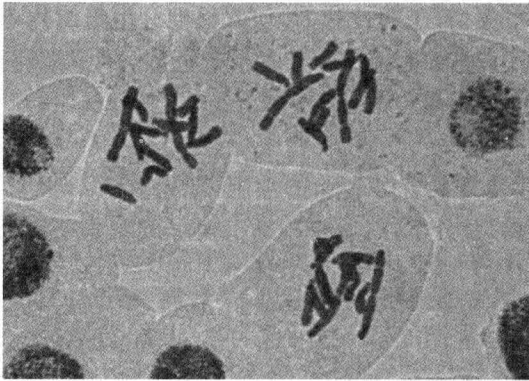


图 1.3 蚕豆有丝分裂中期分裂相



实验二 减数分裂过程中的染色体行为观察

一、实验目的

- (1) 了解高等植物形成花粉时的减数分裂过程。
- (2) 掌握染色体标本制片技术。

二、实验原理

减数分裂只发生在生殖细胞形成的过程中,细胞连续分裂两次,而染色体只复制一次,结果染色体数目减半,所以称作减数分裂。减数分裂包括两次细胞分裂,第一次是减数的,而第二次是普通的有丝分裂。另外,第一次细胞分裂存在一个相当复杂的前期,而且存在同源染色体配对和交叉等现象。

三、实验材料

玉米($2n=20$)雄蕊,蚕豆($2n=12$)花药,洋葱($2n=16$)花药。

四、实验用具和试剂

1. 仪器用具

显微镜,乙醇灯,恒温箱,水浴锅,培养皿,载玻片,盖玻片,镊子,刀片,解剖针,木夹,吸水纸,滤纸,标签,铅笔等。

2. 药品试剂

醋酸洋红,改良品红,卡诺氏固定液。

3. 试剂制备

- (1) 醋酸洋红染色液,见实验一;
- (2) 改良苯酚品红染液,见实验一;
- (3) 卡诺氏固定液,见实验一。



五、实验步骤

1. 取材

选择适宜取材时机是确保能观察到减数分裂各时期的关键。

北方产的玉米需要 5 月份取材,以上午 8:30 时间段为佳。除太老的分枝以外,在每一个分枝中,以中部偏上区域为比较成熟的部分,从此往尖端或基部,小穗逐渐幼嫩。玉米小穗是成对存在的,无柄小穗的发育时期比邻近的有柄小穗的发育时期要早,每小穗中有两朵小花,各有花药 3 个,第一朵小花比第二朵小花幼嫩,第一朵小花的分裂时期依各小穗着生部位不同有一定的顺序性,而同一朵小花的 3 个花药几乎处于同一发育时期。通常在一个分枝上从幼嫩的部位向较为成熟的区域混合制片,可以在一个片子中看到小孢子形成过程中的各个时期。

2. 固定与保存

取刚开始孕穗的玉米植株(此时植株一般有 12~14 个展开的叶片),此时用手摸植株上部(喇叭口下部)有松软的感觉,表明雄花序即将抽出,用刀在顶叶近喇叭口处纵向划一刀,切口长 10~15 cm,剥开未展开的叶片,摘取幼嫩的雄蕊,放入卡诺固定液中固定 12~24 h,用 95%乙醇洗脱醋酸,再移入 70%的乙醇中,置于 4℃冰箱内保存备用,固定时间一般在上午 7~9 时为宜,此时分裂相较多。

3. 染色与制片

从固定保存的材料中取下一朵花蕾,置于载玻片上,用解剖针剥开内外颖片,可以看到 3 枚棒状的雄蕊,留下雄蕊,除去内外颖片,滴加少量的改良苯酚品红(或醋酸洋红),用解剖针将花粉囊挤破,使花粉母细胞游离出来,并将其均匀地涂布在载玻片上,除去囊壁残渣,盖好盖玻片,盖上吸水纸,用拇指轻压盖玻片,吸去周围多余的染液,勿使盖玻片移动。若细胞质染色过深,可在盖玻片一侧滴加 45%乙酸,在另一侧用吸水纸吸,让乙酸从盖玻片下流过,达到分色目的。

4. 镜检

在显微镜下查找花粉母细胞、二分体、四分体、花粉粒及各时期细胞。

六、实验结果

细胞的减数分裂包括第一次细胞分裂(前期 I、中期 I、后期 I、末期 I)和第二次细胞分裂(前期 II、中期 II、后期 II、末期 II)。

1. 前期 I (Prophase I)(图 2.1)