

S722.3

10

林木遗传育种研究法

林木

林木

林木

Yangxinli
南京林业大学
1990.4.5

南京林业大学
林木遗传育种教研组

一九八六年八月

3

林木遗传育种研究法

目 录

1. 树木染色体核型分析
2. 树木染色体 Giemse 分带技术
3. 树木细胞核 DNA 的染色技术
4. 树木细胞内 DNA 含量的光度测定
5. 林木组织 DNA 分离和纯化技术
6. 林木组织培养
7. 林木原生质体的分离和培养
8. 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定树木蛋白质分子量
9. 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦
10. 同工酶分离技术
11. 林木花粉技术
12. 赤霉素对针叶树开花的控制

1 树木染色体组型分析

染色体主要是由 DNA 和组蛋白构成的。不同种属的生物体各有其固有的染色体数目和形态，基因排列在染色体上，形成连锁群。在细胞分裂期间，染色体往往在结构上会呈现各种变化。在光学显微镜下可以看到处于细胞分裂间期的细胞，染色质分散于整个细胞。进入分裂前期，染色质在细胞中云现。又有当细胞进入到前期末和中期时，染色质高度螺旋化，缩短、变粗，形成我们在光镜下看到的染色体。由于染色体本身不具有任何颜色，所以必须经过一定的组织化学方法将其染上颜色，以便人们在细胞分裂中期能观察到它的形态、数量等特征，进行染色体核型研究。

染色体组型或核型 (Karyotype) 是指染色体组在有丝分裂中期的表型 (phenotype)，包括染色体数目、大小、形态以及异染色质的分布的特征。组型分析则是对染色体组中的每一染色体进行测量、计数以及形态特征的描述。通常要测定多个细胞的染色体组，求出上述指标的平均值，绘制染色体组型模式图 (Idiogram)。

植物染色体组型 (核型) 分析，对于研究植物起源与进化、物种之间的亲缘关系以及种间杂交鉴定，对一个物种内不同群体或个体染色体数量和结构变异的比较等都是有价值的，是细胞遗传学研究的基本方法之一。

一、实验准备

(一) 实验材料：松、杉类根尖。

(二) 用具：显微镜、载玻片、盖玻片、镊子、解剖针、刀片、恒温水浴、吸水纸、酒精灯、小烧杯、测微尺、剪刀、直尺、显微照相设备等。

(三) 染色液的配制：

卡诺固定液、1N 盐酸、硫酸铁铵、苏木精、叔丁醇、吡衣红、油派胶。

1. 媒染液：用 4% 铁矾 (硫酸铁铵) 水溶液、取 4 克

1-2

硫酸铁溶于100毫升蒸馏水中，过滤备用，最好用时配制。

2. 0.5% 苏木精水溶液：先将苏木精粉0.5克溶于10 ml 无水或95%酒精中，再加蒸馏水90 ml，未盖瓶塞，不用几层纱布包扎瓶口，静止放置，使其缓慢氧化。一般室温条件下约半月至一月，当氧化成熟为红色苏木精液时，过滤后使用。此液可保存2~3月。

3. 醋酸地衣红：缓慢加入2g地衣红于煮沸的100 ml 45%冰醋酸中，充分溶解，冷却至室温，过滤。

二. 实验步骤：

(一) 铁矾——苏木精染色压片法：

这是比较好的一种方法，由于染色体被染成紫、黑色，照相、效果较好。染色步骤如下：

1. 取材和预处理：取材根尖长至0.5—1 cm时，于上午9—10时将根尖剪下，放在装有0.2%秋水仙碱溶液或0.002 M α -羟基萘林的指形管中，室温下处理3—5小时。

2. 固定：用卡诺固定液固定1—12小时。

3. 解离：将固定过的材料经5%酒精转入蒸馏水中，然后投入已在温箱或水浴中预热60℃的1N盐酸中，在60℃ \pm 0.5℃水浴中溶解10—20分钟。

4. 水洗：解离过的根尖用蒸馏水洗3—4次，每次4—5分钟，除净残留的盐酸，否则影响染色。

5. 媒染：水洗过的根尖浸入4%铁矾水溶液中，媒染1—2小时，如加温30—40℃可缩短媒染时间。

6. 水洗：换水洗4—5次，每次5分钟，务必将残留的铁矾充分洗净。

7. 染色：用0.5%已成熟的苏木精染液染色1—3小时或更长时间，投入根尖后如发现染液混浊则说明媒染后的水洗不彻底，需重洗再染。

8. 兰化：将染色后的材料投入碱性自来水中洗5—10分钟或在自来水中加几滴氨水使材料充分兰化。

9. 压片：取清洁的载玻片，在一端的角处放一条根尖，滴加一滴45%醋酸，也可先在45%醋酸中软化牙签，然后

切取细胞分裂最旺盛部分，盖上盖玻片，首先用镊子在盖片上轻轻的敲打，使材料成均匀的薄层一层；用吸水纸吸去多余的醋酸，用吸水纸放在盖玻片上面，左手手指按住固定盖玻片的位置，勿使其移动，用右手拇指给以适当压力至染色体完全散开。如果材料经前处理适宜，染色体缩短明显，压片时比较容易散开，不必用大力敲打，也能得到染色体完全散开的好片子。

10. 封片：压好的片子，可作短时间观察，此时染色体尚有些膨胀，适于绘绘，照像，压片标本若需长期保存，可制成永久封片标本。

(二) 醋酸地衣红压片法

该法对某些植物材料染色效果较好，染色体能染成深红色，方法简便，具体步骤如下：

取材 → 预处理 → 固定 → 解离（同前） → 染色：
 将根尖置载玻片上，加一小滴染色液，用镊子把材料压成小块，加盖片，由于地衣红染色着色力强，染色较深，因此不要在压片前用火烤，而在压片后再用火烤，这样，不致于退色，而可以使染色体加深染色，然后镜检。

(E) 核型分析

1. 照相放大：对所获得的染色体制片，进行细致地观察研究，并选择最好的分裂相进行显微摄影并放大，一般需选择10-40个染色体收缩适度，染色体均较平直，清晰的细胞，进行显微摄影及测量。

2. 测量：根据放大照片，进行测量。需要测量的项目有：

- (1) 染色体数目
- (2) 染色体的绝对长度：测量每一染色体从一端至另一端的长度，因染色体的绝对长度随细胞分裂时期的不同长度有所变化，同时因预处理作用时间的长短对其长度也有影响，故染色体的绝对长度变化较大，其数据只有相对意义。
- (3) 染色体的相对长度：每一染色体的绝对长度和单倍体组的总长度之比，以百分数表示，染色体的相对长度数据

1-4

比较稳定。

(4) 着丝点定位：

a. 长短臂比值：长臂与短臂之比，简称臂比或臂率。

$$\text{臂比}(Y) = \frac{\text{长臂}(L)}{\text{短臂}(S)}$$

b. 着丝点位置：

$Y = 1.0 - 1.7$ 为中间着丝点 (M)

$Y = 1.7 - 3.0$ 为近中着丝点 (SM)

$Y = 3.0 - 7.0$ 为近端着丝点 (ST)

$Y = 7.0 - \infty$ 为端着丝点 (T)

c. 着丝点指数：染色体的短臂绝对长度与染色体绝对全长之比 (%)。

(5) 若有次缢痕和随体：应标明位置。

(6) 配对：根据目测和染色体相对长度、臂率、次缢痕的有无和位置、随体的有无、形状和大小，进行同源染色体剪贴、配对。

(7) 排列：染色体的排列一般是从大到小，相同长度的染色体，以短臂长的在前，有特殊标记的染色体（如有随体）可特殊排列，性染色体单独另排。

SAT 为具随体染色体，随体的长度可计标在内，也可不计标在内，但要说明。

(8) 翻拍与绘登：对剪贴排列好的染色体组型可进行翻拍或绘制组型模式图。

四. 实验要求

1. 在显微镜下对已经制备好的片子进行染色体观察并计数，并绘制最好的分裂相。

2. 剪下的染色体按顺序排列的染色体盒放于中间。

3. 根据照片进行染色体的测量，将数据填入附表。

五. 附图

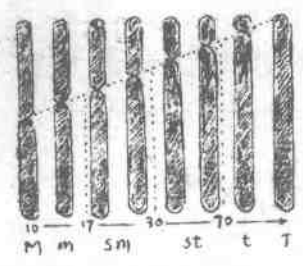
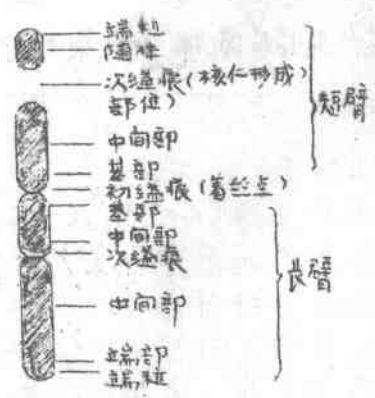


图1 染色体基本结构

图2 根据着丝点位置划分染色体类型

1-6

染色体形态测量数据

编号	绝对长度	相对长度	短臂	长臂	臂中	着丝点	指痕	随体	次缢痕	类型

4. 用文字简要说明, 着丝点位置, 随体以及其他有关形态问题。

2 树木染色体Giemsa分带技术

染色体Giemsa分带是七十年代初兴起的细胞学新技术，它通过一系列处理使染色体显示再特定的带纹。由于染色带的数目、位置，宽窄与浓淡具有相对的稳定性，所以可以作为鉴别染色体的重要依据；通过深入研究分带的机理，可以揭示染色体的成分、结构、行为、功能，因此，在细胞学与遗传学的理论研究领域内，以及医疗诊断，植物育种等方面，染色体分带均为有用的一种新技术。

植物染色体分带技术包括荧光分带和Giemsa分带两大类。荧光分带是最早用于染色体的方法，是1968年瑞典细胞化学家卡斯珀森提出的，但此法需用荧光显微镜及荧光分带不能长期保存，故发展缓慢，因此，当前用于植物染色体分带的主要是Giemsa分带。在动物材料上，由于分带处理的条件不同，可产生G一带，O一带，R一带，cdl一带，T一带等。但在植物材料上，据报道除个别植物外，大多只能产生C一带，所以用于植物染色体分带的主要是Giemsa C一带技术，当前用于植物染色体Giemsa-C分带方法主要有BSG法，HSG法和胰酶-Giemsa法。1982年朱凤媛等报道应用胰酶解火焰干燥制片方法，再进行BSG法处理在林木上进行分带实验效果好。此法称为下-BSG法，这里主要介绍下-BSG法。

一. 实验准备

(一) 实验材料：松树根尖

(二) 用具：显微镜，载玻片，盖玻片，镊子，解剖针，刀片，恒温水浴，吸水纸，试剂瓶，量筒，滴瓶，染色缸等。

(三) 试剂：(试剂配制见附录)

Giemsa 母液，Sorensen 磷酸缓冲液，2xSSC 溶液，盐酸，甲醇，乙醇，冰醋酸，氢氧化钡，8-羟基喹啉，纤维素酶，果胶酶。

2-2

二、实验步骤

(一) 取材和予处理：取已发芽的松树种根尖径 0.002M — 0.004M ， 18°C 分别处理2—6小时。

(二) 前低渗： 0.075M 的 KCl 溶液 18°C — 28°C 处理20分钟，蒸馏水洗净。

(三) 酶解： 2.5% 果胶酶及 2.5% 纤维素酶的混合溶液调整 pH 值5—5.5， 18°C — 28°C 酶解至根尖的分生组织（乳白色）接近脱落为度。一般植物处理3小时，木本植物根较粗，处理时间可延长至4—5小时。

(四) 后低渗：蒸馏水 18°C — 28°C ，处理20分钟。

(五) 固定保存：甲醇冰醋酸（3:1）固定4—24小时，可以当时制片，也可以在冰箱中保存，一个月内随时取用制片。

(六) 火焰制片：截取分生组织置于载玻片上，在甲醇冰醋酸固定液中用镊柄捣碎，再滴加固定液，在酒精灯上火焰烤干。

(七) 变性处理： 5% $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液， 18°C — 20°C 处理20分钟，用 50°C — 60°C 温水漂净钡膜，并多次冲洗。

(八) 复性处理： $2\times\text{SSC}$ ($0.3\text{M NaCl} + 0.03\text{M Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) 溶液在 60°C 中温浴1小时，蒸馏水洗净，干燥。

(九) 染色：用Sorenson缓冲液， pH 值6.8稀释 10% Giensa 染液，把染色体带纹染成紫红色。各植物需要的染色时间很不一致，一般室温下，马尾松需半天至一天以上，染色后用蒸馏水洗净，晾干。

(十) 封片观察：在空气中干燥后直接在显微镜下观察或在二甲苯内透明1小时以上，用达马胶封片后进行带型分析，并显微摄影。

(十一) 带型分析：植物染色体带型分析迄今未能标准化。个别研究者也提过某些带纹的表示方法（符号），但未被普遍接受，一般说来带型分析时必须要有整个染色体组成的带型照片，每对染色体带纹的详细说明，最后绘制成带型模式图。

1. 对带纹清晰、染色体分散而且完整的细胞仔细观察，挑选若干细胞进行显微照相，冲洗放大后按组型剪贴排列。

2. 对每条染色体上的带纹，按位置（着丝点带（c），末

端带 (T), 中间带 (I), 核仁溢痕带 (N), 全带 (W) 和无带 (O), 宽窄, 染色深浅, 形状等仔细描述记录下来。

3. 按照组型分析的数据, 先绘制四染色体模式图, 然后参照带型照片逐条染色体添上带纹, 带纹的位置, 宽窄, 深浅, 必须按比例绘制, 务求准确。

三、实验要求

1. 绘作你所做的核衬染色体 Giemsa C-带 (F-BSG法) 图。

2. 根据发给的照片, 绘制两种植物染色体 Giemsa C-带模式图, 并用符号写出带型。

四、附图

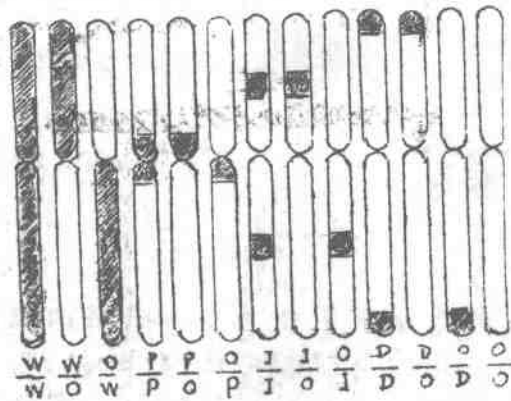


图1. 植物染色体 C-带 (黑色部分) 的 14 种类型
W: 全染色体; O: 无; P: 基部; I: 中间部; D: 端部。
横线上侧表示短臂, 下侧表示长臂。

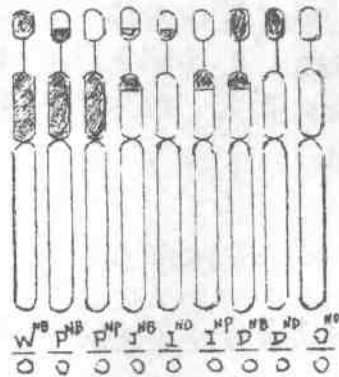


图2. 在核仁形成部位周围的C-带(黑色部分)类型。

字母表示与图1相同，这里NB表示核仁形成部位两侧；NP表示相同基部；ND表示相同端部；NO表示没有显现。

附录：试剂配制

- 一. Giemsa 粉剂 0.5g
 甘油(A.R.) 33 ml
 甲醇(A.R.) 33 ml

将 Giemsa 粉末先溶于少量甘油，在研钵内研磨(30分钟以上)至无颗粒为止，再将全部剩余甘油伴入，于56℃温箱内保温一小时，再加入甲醇，保存于棕色瓶中，置于冰箱内。

二. 2x SSC 溶液(0.3 M NaCl + 0.03 M 柠檬酸钠)
 称取 NaCl 17.53g 和柠檬酸钠 8.8233g 置于容量瓶中，加水至 1000 ml。

三. 盐酸溶液的配制

用酸式滴定管量取浓盐酸配成所需当量浓度的盐酸。

	比重 1.19	比重 1.16
0.1N HCl	8.25 ml	9.83 ml 加水至 1000 ml
0.2N HCl	16.5 ml	19.66 ml 加水至 1000 ml
1N HCl	82.5 ml	98.5 ml 加水至 1000 ml

四、磷酸缓冲溶液

A 液：配制 0.067 M 磷酸 = 氢钾

称取磷酸 = 氢钾 9.18 克置于容量瓶，加蒸馏水至 1000 ml.

B 液：配制 0.067 M 磷酸氢 = 钠

称取磷酸氢 = 钠 9.467 g 置于容量瓶，加蒸馏水至 1000 ml.

按用时按下列比例配制缓冲液

pH 值	溶液 A (ml) +	溶液 B (ml)
6.5	68.7	31.3
6.6	62.8	37.2
6.7	57.0	43.0
6.8	51.0	49.0
6.9	44.8	55.2
7.0	38.8	61.2
7.1	33.0	67.0
7.2	27.6	72.5
7.3	22.3	77.7
7.4	18.2	81.8

一、關於...

二、關於...

三、關於...

四、關於...

關於...

五、關於...

六、關於...

七、關於...

八、關於...

九、關於...

十、關於...

十一、關於...

十二、關於...

十三、關於...

十四、關於...

3. 树木细胞核DNA染色技术

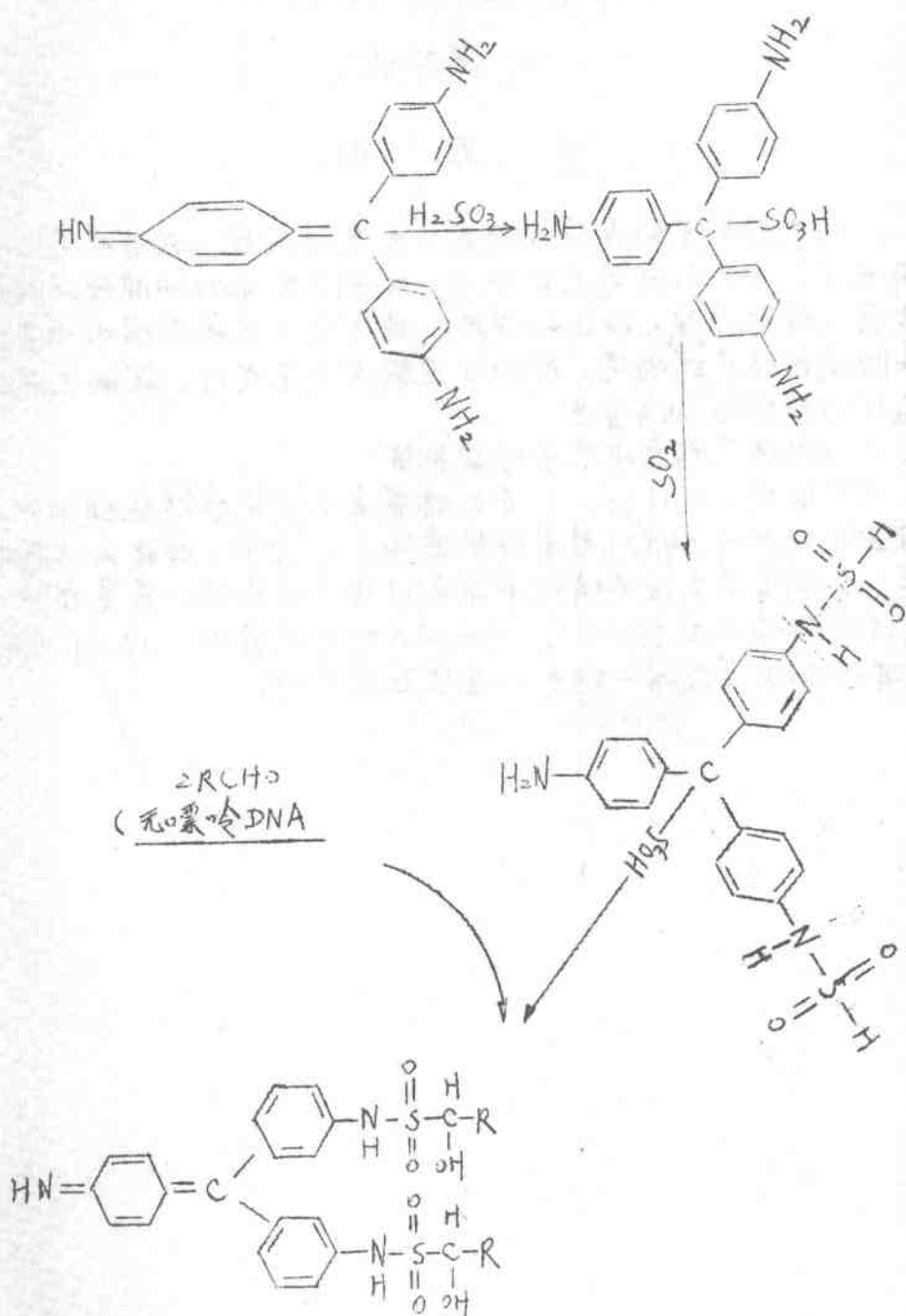
— 孚尔根法

— 原 理

细胞核在可见光范围内是无色的物质，在紫外光下才有吸收，为了在可见光条件下，观测染色体和细胞核的结构，必需在核酸中导入特定的染料，使之在可见光范围内用普通显微镜就能进行观察，借助于显微分光光度计，就能测定出每与细胞核的DNA含量。

细胞核染色常用孚尔根染色法：

孚尔根 (Fulgon) 反应的基本原理是细胞经酸水解，除去细胞中的RNA和脱氧核糖链上的嘌呤，释放出功能醛基，这些醛基在钨试剂中染色形成紫红色的加层复合物。它的吸收峰落在550—570 nm的可见光范围内。Shift试剂是进行DNA染色的一种专一性很强的染料。



季尔根反应途径示意图

2. 孚尔根染色方法

1. 取样
剪取发芽种子的根尖固定，根尖长度以0.7—1.5 cm为好。
2. 固定
将上述根尖固定在Carnoy I 固定液中国定一小时以上。
3. 水合
将固定后的根尖用70%—50%—30%的乙醇水合到水。
4. 水介
将上述根尖在5N HCl 中25°C下水介20—25分钟。
5. 水洗
将水介后的样品迅速置于预先冷却的蒸馏水中冲洗2—3次。
6. 染色
将上述样品在配制好的Schiff试剂中，在37° 黑暗下染色1—2小时。
7. 漂洗
配制5%的偏亚硫酸氢钠漂洗液，将染好的根尖漂洗三次，每次5—10分钟，再置于蒸馏水中。
8. 压片
取根尖1—2个，置于清洁的载玻片上，滴一滴45%的醋酸。用盖玻片压片，使材料压成均匀的薄层，分散细胞。
9. 封片
用刀片轻轻揭开盖片，气干后印树脂胶封片。
10. 镜检。