



高等教材

全 国 高 等 农 林 院 校 教 材
QUANGUO GAODENG NONGLIN YUANXIAO JIAOCAI

林木繁育实验技术

主 编 赵绍文 副主编 梁一池



中国林业出版社

S723.1-33
Z327.1

全国高等农林院校教材

林木繁育实验技术

主 编 赵绍文 副主编 梁一池

中国林业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

林木繁育实验技术/赵绍文主编. - 北京: 中国林业出版社, 2005. 9
ISBN 7-5038-4066-8

I. 林… II. 赵… III. 苗木-育苗-实验 IV. S723.1-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 097903 号

中国林业出版社·教材建设与出版管理中心

电话: 66170109 66181489 传真: 66170109

出版 中国林业出版社 (100009 北京西城区德内大街刘海胡同 7 号)

E-mail: cfphz@public.bta.net.cn 电话: 66184477

网址 www.cfph.com.cn.

发行 新华书店北京发行所

印刷 北京市昌平百善印刷厂

版次 2005 年 10 月第 1 版

印次 2005 年 10 月第 1 次

开本 850mm × 1168mm 1/16

印张 19.75

字数 480 千字

定价 27.00 元

凡本书出现缺页、倒页、脱页等质量问题, 请向出版社图书营销中心调换。

版权所有 侵权必究

《林木繁育实验技术》编写人员

主 编：赵绍文

副 主 编：梁一池

编写人员：（按姓氏笔画排序）

王凌晖（广西大学）

孙小霞（福建农林大学）

陈炳铨（华南农业大学）

陈跃红（华南农业大学）

胡彦师（华南热带农业大学）

赵绍文（广西大学）

黄寿先（广西大学）

梁 机（广西大学）

梁一池（三明学院）

潘晓芳（广西大学）

前 言

《林木繁育实验技术》是顺应高校理论和实践两大支柱教学改革潮流，从森林培育学、林木遗传育种学和经济林与果树栽培学3门课程中剥离出来、独立开设的新型实验技术课程。通过实验或试验使学生能学到并熟练地掌握几项实用技术，以达到培养学生的创新精神、动手能力和随时空变化的应变能力。

随着林业科学和交叉学科的进步与发展，林业生产技术日新月异，原有的实践教学模式面临严峻的挑战，与国民经济发展需要开拓创新人才的距离拉大，因此，需要加快高等林业院校实践教育的改革力度，以适应社会的发展。该教材就是在此背景和深入调查研究的基础上启动编著的。

改革开放以来，现代科学技术的进步和学科之间的渗透，大大丰富了实践教学的内涵和外延。对过去3门课程的实践教学从内容、方法、环节、衔接和重叠等诸方面进行认真分析研究，提出“调整与合并、删除与增加、综合与创新、拓宽与深入、先进与实用、实践与总结”30字方针。在课程内容的论述上既不能是理论课程的重复，更不是这些课程实验指导书的再现，这种关系的恰到好处的处理是该实验技术教材的生命线，我们在编写过程中做了大胆地尝试。

在上述指导思想的运作下，根据当前林业和交叉学科发展的趋势，我们拟订实验37个，每一个项目都有独特的创意，并具备完整的操作系统：实验目的与意义、该项目的概念与发展趋势、实验原理、实验方法与步骤、实验结果与评价体系等。

本教材涉及林学、园林、森林资源、生态、水土保持等专业，内容包括林木遗传育种、种子生产、苗木培育、田间试验设计和实用技术等最新研究成果、实验方法、试验方案。教材主要面向学校、科研和生产单位。

本教材由广西大学、三明学院、华南农业大学、华南热带农业大学、福建农林大学等5所院校10位教授、副教授共同编撰完成。由于时间仓促和水平有限，书中错误在所难免，恳请批评指正。

编 者

2005年2月

目 录

前 言

第一篇 林木细胞学基础

实验一	植物细胞有丝分裂过程观察及染色体的常规压片技术	(3)
实验二	林木染色体组型分析	(12)
实验三	林木染色体的显带技术和带型分析	(16)
实验四	林木同工酶酶谱分析	(21)
实验五	林木花粉发育过程的观察	(29)
实验六	花粉生活力测定技术	(33)

第二篇 林木育种技术

实验七	林木杂交育种	(39)
实验八	木本植物组织培养	(47)
实验九	植物多倍体的诱导及鉴定	(59)
实验十	林木优树选择	(64)
实验十一	林木优良种源选择	(72)
实验十二	林木遗传测定	(77)
实验十三	林木种子园营建	(82)

第三篇 林木种子品质测定与标本制作

实验十四	林木种子品质鉴定样品抽样技术	(91)
实验十五	林木种子物理性状的测定	(97)
实验十六	林木种子发芽测定	(104)
实验十七	林木种子生活力和优良度的测定	(110)
实验十八	林木种子干标本的制作	(115)
实验十九	果实液浸标本的制作	(129)

第四篇 林木育苗技术

实验二十	南方速生丰产树种播种苗培育技术	(137)
实验二十一	林木扦插繁殖技术	(147)
实验二十二	南方经济林嫁接苗培育技术	(156)
实验二十三	南方速生丰产树种容器苗培育技术	(169)
实验二十四	移植苗的培育技术	(176)

实验二十五	四唑盐染色法测定苗木根系活力	(179)
实验二十六	苗木根生长潜力测定	(182)

第五篇 林木繁育实用技术

实验二十七	植物生长调节剂在育苗中的应用	(189)
实验二十八	除草剂在林业中的应用	(199)
实验二十九	经济林果树种植园梯级修筑技术	(209)
实验三十	经济林果树落花落果控制技术	(214)
实验三十一	果树树形修剪技术	(218)

第六篇 林木繁育调查与设计

实验三十二	苗木调查与评价	(239)
实验三十三	林木苗圃调查设计	(246)
实验三十四	林木田间试验设计	(255)
实验三十五	林木遗传交配设计	(272)
实验三十六	林木种子园配置设计	(281)
实验三十七	现代化苗圃设计	(289)
附 表		(297)

第一篇

林木细胞学基础

实验一 植物细胞有丝分裂过程观察 及染色体的常规压片技术

一、有丝分裂过程

细胞分裂是生物进行繁殖的基础。高等生物的细胞分裂主要是以有丝分裂方式进行的。细胞有丝分裂的过程是遗传物质从一个细胞均等地分向两个新形成的细胞，这是一个连续的过程，但为便于描述起见，通常分为前期、中期、后期和末期。

1. 间期

是指细胞分裂末期到下一次细胞分裂前期之间的一段时间。在光学显微镜下观察，看不到染色体结构，只能看到均匀一致的细胞核及其中许多的染色质，尽管该时期从细胞外表上看似乎是处于静止状态，但实质上间期的核处于高度活跃的生理生化的代谢阶段，贮备了细胞继续分裂时所需的物质。很多实验证明，DNA 在间期进行了自我合成，这个时期核内 DNA 的含量是加倍的。

2. 前期

细胞核内出现细长而卷曲的染色体，并逐渐缩短变粗。每一条染色体有两个染色单体，它们具有一个共同的着丝点；核仁和核膜逐渐模糊不清。

3. 中期

核仁和核膜逐渐消失，各染色体排列在赤道板上，从两极出现纺锤线，分别与各染色体的着丝点相连形成纺锤体。在中期，染色体呈分散状态，且具有典型的形状，便于鉴别染色体的形态和数目。

4. 后期

各染色体着丝点分裂为二。其每条染色单体也相应地分开，并各自随着纺锤线的收缩而移向两极，每极有一组染色体，其数目与原来细胞的染色体数目相同。

5. 末期

分开在两极的染色体各自组成新的细胞核，在细胞质中央赤道板处形成新的细胞壁，使细胞分裂为二，形成二个子细胞。这时细胞又恢复为分裂前的间期状态（图 1-1）。

采用植物染色体压片技术对植物根尖或茎尖等分生组织（细胞）进行操作，便可观察到有丝分裂各个时期染色体的变化特征和中期染色体的形态及数目。

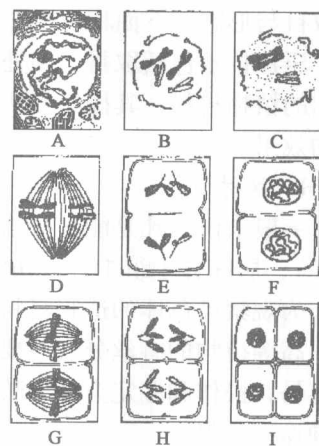


图 1-1 有丝分裂图解

A-C. 前期 I D. 中期 I

E. 后期 I F. 前期 II

G. 中期 II H. 后期 II

I. 末期

二、植物染色体压片技术的步骤与原理

植物染色体的检查是根据植物细胞在有丝分裂期与性细胞减数分裂时期染色体可被着色的原理,通过染色制片而进行观察的。通常有压片涂片法、去壁低渗火焰干燥法和石蜡切片法。

压片法是以人工外加机械压力而使染色体分散。此法操作快速简便,节省材料,能使细胞内所含染色体完整地保存下来,效果较好。去壁低渗火焰干燥法则是以酶分解细胞壁,以低渗液使细胞膜吸胀和火焰干燥及水表面张力而使染色体自行展开。这种方法操作稍繁且需要酶制剂,但染色体易于展开且不易导致染色体变形,尤其对一些含较多成熟细胞的组织(芽、愈伤组织等),其制片效果则优于压片法。石蜡切片法是对材料进行固定、脱水、透明、浸蜡及包埋后,再进行切片、粘片、溶蜡和染色观察。这种方法能切成极薄而连续的切片,是显微技术上最重要且常用的方法,但此法的操作步骤较复杂,且不能获得完整的染色体数目与形态。下面将主要介绍操作简便、应用广泛的压片法的步骤与原理。

压片技术包括取材、预处理、固定、解离、染色、压片、封片等步骤。值得注意的是,不同的植物材料,其操作方法不尽相同,每种植物都必须经过反复的试验与摸索,才能取得好的效果。

1. 取材

一般来说,凡是能进行细胞分裂的植物组织或细胞,如植物的顶端分生组织(根尖和茎尖),居间分生组织,愈伤组织、幼胚及胚乳,大小孢子母细胞的减数分裂时期等,都可以作为观察染色体的适宜材料。

高等植物的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材料。根尖材料可以从以下多种途径获得。

(1) 种子萌发取根 这是最常用的方法,此法不受季节的影响。为了获得良好的种子根,除种子的饱满度和生活力等,种子的萌发条件的选择,对获得生长健壮的根尖材料也很重要。经验表明,生长健壮的根尖不仅细胞分裂频率较高,而且染色体形态也较平直;而根尖生长势差的材料不仅分裂频率低,且染色体形态也多是扭曲的。因此,应根据种子的不同特点选择不同的萌发条件或培养方法。常用的方法有:①滤纸培养法;②纱布培养法;③蛭石、锯末或砂土培养法;④水培法;⑤试管培养法(适于稀有、珍贵植物种子,经消毒后置于MS琼脂培养基上培养)。

(2) 鳞茎水培取根 此法适用于洋葱、蒜、中国水仙等。水培中经常更换新鲜的同温水,是获得良好材料的关键。

(3) 扦插取根 此法适用于扦插繁殖为主的杨、柳、桑、葡萄等植物。

(4) 从植株上直接取根 此法适用于大部分禾本科植物。

有些难以获得种子或种子不易发芽的木本植物,如许多果树、竹类、木本花卉等,可考虑用茎尖压片。应取已萌动或正在伸展的芽为材料(注意休眠芽不适于作细胞学观察),将幼芽外部的叶片除去后,在放大镜下仔细解剖,切取生长锥和叶原基部分。

另外,取材的时间很重要,只有在根尖旺盛生长时取材,才能获得较多的分裂相。据我们观察,树木根尖细胞整天都在不同步的分裂,但以一天中温度较高的时段取材,往往效果较好。

2. 预处理

在植物体细胞染色体的观察和研究中,无论是进行染色体计数,还是核型分析以及分带,一般均以有丝分裂中期的染色体最为合适。因为此期的染色体高度浓缩,形态和结构也比较清晰。但在有丝分裂周期中,分裂中期持续的时间很短,一般只有10~30min。因此,在正常条件下,分裂中期相所占比例很小。此外,分裂中期的染色体紧密排列在细胞的赤道板上,又有纺锤丝的牵连,所以,在制片时,是很难将其分散开的,尤其是染色体较大或数量比较多的材料,很容易导致染色体的严重重叠,不仅影响识别单个的染色体形态,有时甚至连计数也困难。

为了克服上述困难,体细胞染色体制片,一般需要用化学的或物理的方法对材料进行预先处理。这些方法的作用机理在于阻止或破坏纺锤体微管的形成。由于不能形成纺锤体,因此,有丝分裂过程被阻抑在分裂中期阶段,这样便可以累积比较多的处于分裂中期的染色体。预处理的另一作用是可以导致染色体高度浓缩,使染色体变短,从而利于染色体的分散。所以,预处理是否适宜,是染色体制片技术中最关键的操作步骤。

(1) 药剂处理 通常应用的预处理药剂有:秋水仙碱,8-羟基喹林和对二氯苯等。

a. 秋水仙碱:对阻止纺锤体的活动效果显著,易获得较多的中期分裂相。同时,染色体线性缩短的结果,易使染色体变直,染色单体分开而只在着丝点处相连,这对研究染色体结构很有利。由于不同植物和器官对它的反应不同,所以有效浓度变化较大,常用0.01%~1%,处理时间一般为1~4 h。

b. 8-羟基喹林:其作用与秋水仙碱相似,常用浓度0.004%~0.005%,处理时间3~4 h,该药剂对中等或长染色体的植物较适合。

c. 对二氯苯:对防止纺锤体的活动和缩短染色体效果也很好,但在大多数的情况下,其预处理结果是染色体缩短而染色单体不分开,若要对染色体结构的分析则不及秋水仙碱,但作一般的形态观察及计数,则优于秋水仙碱。尤其是对染色体小而多的植物染色体计数,则为前二者所不及,同时配制使用方便,价格低廉。常用其饱和水溶液,处理时间一般为3~5 h。用以上各种药剂处理时,都应注意温度不能过高,以10~16℃为宜。

(2) 冷冻处理 低温处理也可以阻抑纺锤体微管的组装,与预处理药物有类似的功效。方法是将根尖放入盛有蒸馏水的指形管中,置于冰水共存的冰瓶中,然后将冰瓶放到0~3℃的冰箱内处理24 h。染色体数较多的材料可适当延长时间,但需注意勿使材料结冰。

3. 固定

经预处理的材料应立即移入固定液内进行固定,其目的是利用药物把正在分裂的细胞迅速杀死,使之固定下来,并尽量保持细胞组织的原有形态结构。经固定后的材料,其解离和染色效果比未经固定的材料好。

作为染色体压片材料的固定剂,一般要求固定作用迅速,即能迅速地渗入材料,杀死原生质,固定其微细结构。固定液尽可能不含金属离子,以排除它对染色体的干扰作用。一般采用卡诺氏(Carnoy)固定液。配法是:冰醋酸1份,纯酒精3份混合。如果材料较硬可使

两种药物的比例改变,如纯酒精:冰醋酸等于1:2或1:1。

固定时间一般2~24 h,视材料大小而定。材料小,则固定时间可缩短些(2~5 h);材料大,则时间可长些(12~24 h),一般不要超过24 h,作醋酸洋红和孚尔根反应的压片可短些,如作苏木精染色宜长些。固定时固定液一定要充足,一般材料与固定液之比为1:20。

已经固定的材料如不是立即观察的,可放入70%酒精中保存,如放置于低温冰箱中保存更好,但贮藏过久的材料往往不易使染色体着色,效果不如新鲜材料好,所以应尽可能在固定后立即进行压片观察。

4. 解离

已经固定的材料在压片观察之前要进行解离。解离就是经过某些处理去掉细胞之间的果胶层物质,使之彼此分离并使细胞壁软化,经过细胞分离和软化后的组织才便于压片。最常用的解离方法有酸水解和酶处理,一般情况下用前者,酸水解通常有两种方法:

(1) 固定后的材料经50%酒精转至蒸馏水中洗涤后,转入预热60℃的1N盐酸处理5~20 min(水浴锅或恒温箱中),有些可达30 min,各种不同的材料处理时间不同,需经过试验。如果材料要用孚尔根染色液染色,则温度误差应严格控制在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。如用其他方法染色,温度误差可允许 $\pm 2^{\circ}\text{C}$,盐酸也可用10%的浓度。

(2) 用95%的酒精与浓盐酸(1:1)在室温下处理材料5~20 min。此法应用于难以解离和软化的植物组织。由于盐酸浓度太高,不如上法安全可靠,如处理不当会对细胞染色体结构破坏严重。

材料水解后,必须用蒸馏水彻底冲洗,直至达到中性,否则会影响染色效果。某些细胞壁比较坚硬而又难以软化的材料,其细胞难以压平,染色体也不易分散,则可采用酸水解和酶处理相结合的方法,可得到良好效果。具体方法是:将固定的材料放入50%乙醇中5 min,再转入蒸馏水中换水洗几次,约30 min,彻底洗净乙醇。再用适量的2%纤维素酶和果胶酶(2:1)混合液在约37℃恒温箱中解离30~60 min,使根尖软化。去酶液,用卡诺氏固定液重新固定10~30 min;去固定液,加入1N HCl于室温下处理约10 min;去HCl,以蒸馏水洗约10 min,然后,用石碳酸品红染色和压片。

5. 染色

染色的原理是利用一些能将染色体染上颜色,而细胞质不着色的染料来进行染色的。这些染料通称核染料,常用的有洋红、地衣红、苏木精、碱性品红等。不同的植物或同一植物不同部位的材料,对某种染料的着色能力有差异,应经过反复试验,摸索出适合该植物最有效的核着色染料。根据植物材料的不同,其染色液的配制、染色压片的过程均有差异,于是构成了不同的染色压片法。目前最常用的方法有醋酸洋红法、铁矾-苏木精法、孚尔根反应法、石碳酸品红法,其中以醋酸洋红法应用历史最久。

6. 压片

取一根尖置于清洁载玻片上,切除根冠及分生区以外的部位,留下分生区约1~2 mm,纵剖为二,只取一半,加一小滴染色剂或45%醋酸,用镊子将根尖压碎加盖片,再压一滤纸片于盖片左下角,并用左手食指压紧,右手持解剖针先用针尖轻敲盖片,使材料分散,均匀铺成一薄层,然后换用铅笔的橡皮头先轻后重地敲击盖片(注意切勿使盖片移动),使染色体分散压平。敲击用力大小视材料而定,一般具大染色体的材料(如蚕豆、洋葱、杉

木),可轻敲击盖片而后用拇指紧压而使染色体分离。如重敲则容易使染色体从着丝点处断裂。而染色体较小的材料(如杨树),则需要重敲击盖片,才能使染色体分散和压平,这类小染色体,重敲也不易使染色体断裂。总之,操作方法需要根据材料的性质和压片方法的特点灵活掌握,多练习操作方可熟能生巧。

7. 镜检及永久玻片的制作

做好的压片放置显微镜下检视。如染色体清晰、分散,中期分裂相较多者,就可作永久玻片长期保存。

(1) 一般永久片制作方法

a. 脱盖玻片:用刀片把临时片上盖玻片周围的石蜡刮净,用毛笔刷掉石蜡屑后,再蘸二甲苯少许擦去残留的石蜡,或用45%醋酸除去水溶的封藏剂。如刚制作的临时片,最好过几小时后再进行脱片。把临时片翻转,盖玻片朝下,放入盛有脱盖玻片液(1份45%醋酸+1份95%酒精)的培养皿(编号①)中,将载玻片的一端搁在短粗玻棒上,呈倾斜状,让盖玻片自然滑落。盖玻片脱落后2~3 min,分别取出盖玻片和载玻片,用吸水纸将玻片上的溶液吸干,注意不要触动载玻片上的材料。

b. 脱水、透明:取3只培养皿,分别编号②、③、④,在其中各放一根短粗玻棒,顺序加入下列脱水剂:2份95%酒精+1份正丁醇、1份95%酒精+2份正丁醇。

操作时,用镊子把①号培养皿中已脱落的盖玻片和载玻片从脱盖玻片液中取出,稍干后迅速放入②号培养皿中,依次脱水、透明,最后放入④号培养皿中,在各编号培养皿中分别浸泡5min左右。

整个脱水过程中,必须保持载玻片和盖玻片原来相对的方向和位置,同时注意操作轻巧,以免造成玻片上材料漂失。

c. 封片:从④号培养皿中取出载玻片和盖玻片置于滤纸上吸除多余的溶剂,在载玻片中央载有材料处滴上1~2滴中性树胶,将盖玻片盖回原来位置进行封片。覆盖盖玻片时,要注意用鸭嘴镊子夹住盖玻片,轻缓地倾斜覆盖,使之随着树胶的扩展自然下滑,切不可施加压力或移动盖玻片。如发现封片中树胶有气泡,应让其自行逸出或用针尖烧热后烫一下,使气泡逸出。如树胶滴得过多溢出盖玻片四周,应待树胶晾干后,用脱脂棉蘸二甲苯轻轻擦净溢出的树胶。

封片后平放晾干,进行镜检,物象清晰符合要求的则可保存,并贴上标签,注明标本名称、作者姓名和制片日期。

(2) 叔丁醇法制作永久片 将编号的4只培养皿顺序加入下列脱水剂:1份45%冰醋酸+1份95%乙醇、95%丁醇、1份95%乙醇+1份叔丁醇、叔乙醇。

其他制片操作方法与上述的一般永久制片法相同。

三、常用的染色剂及染色方法

用于植物染色体染色的方法很多,各种染色方法都有其自身的特点及适用的材料。下面介绍目前较常用的几种染色剂及染色压片方法。

1. 洋红及醋酸洋红染色法

洋红是从胭脂虫 (*Coccus cacti*) 的雌虫中直接提取的一种染料, 为非结晶性的紫褐色物质, 是一种复杂的化合物, 能将细胞中某些部分染成红色。洋红在中性溶液里溶解度很小, 因此, 必须溶在酸性或碱性溶液里。

(1) 染色液的配制 先将 100 mL 45% 的冰乙酸装入 200 mL 的锥形瓶或短颈烧瓶中加热煮沸, 移去火源, 然后, 缓缓加入 1g 洋红粉末, 并不断搅动使其溶解。在此操作过程中应特别注意防止溅沸。待完全溶解后, 重新置火上加热煮沸约 1~2 min, 此时, 可用细线悬一生锈的小铁钉浸入染色液中, 约 1 min 取出, 或加入氢氧化铁的 50% 的乙酸饱和液 1~2 滴 (不能多加, 以免产生沉淀)。铁为媒染物, 染色液中稍含微量铁离子, 可明显增强洋红的染色能力。配制完毕, 在室温下静置约 12h 后过滤于一棕色试剂瓶中, 贮存备用。

(2) 染色与压片 取经解离处理后并用蒸馏水换洗 3~4 次, 除净残留盐酸的根尖材料放在载玻片上, 加一小滴染色剂 (绝不能多), 用前面所述的压片方法压片。如果染色体着色不好, 可将载玻片在酒精灯的火焰上来回烘, 但不要使染色液煮沸冒泡。此步目的是破坏细胞质, 增进染色体与背景反差。

2. 铁矾—苏木精染色法

苏木精为一种天然染料, 是从墨西哥引进的一种豆科木本植物——洋苏木的心材中提取出来的, 其分子式为 $C_{16}H_{14}O_6$, 是目前应用最广泛、最优良的核染色剂, 其显著特点是几乎对所有植物的任一组织中细胞核或染色体均能强烈着色且保存性良好, 但它本身与细胞的亲和力很差, 不能直接染色, 必须依靠媒染剂的作用才能对细胞染色。

(1) 媒染液与染色液的配制

a. 媒染液: 配 4% 的铁矾 (硫酸高铁铵) 水溶液, 硫酸高铁铵最好是淡紫色结晶, 若是粉末状, 则表明已变质。此液最好现配现用, 不宜保存过久。

b. 染色液: 一般用 0.5% 苏木精水溶液。此液需预先配成, 配法是先先将苏木精 0.5 g 溶于 10mL 95% 酒精或无水酒精中, 再加蒸馏水 90mL, 不加瓶塞, 用几层纱布包扎瓶口, 静置, 使其缓慢氧化。一般室温条件下约半个月可氧化完全, 此时溶液变红色, 过滤后使用。此液可保存 2~3 月, 当染色液有沉淀, 变黄褐色则不能使用。

此液如不能预先配成, 可在配好的染液中加 3~5 滴过氧化氢, 加速氧化, 但不能过量, 否则将容易产生沉淀使染色液变质。或在配好 10 mL 酒精染液后加 90 mL 煮沸的蒸馏水, 冷却后即可使用。

(2) 染色制片步骤

a. 取材和预处理: 当油茶或马尾松、杉木根长至 2~3 cm 时, 用刀片截取 0.5 cm 长的根尖, 浸入对二氯苯饱和溶液中, 在室温下处理 4~5 h。

b. 固定: 用卡诺固定液固定 8~24 h。

c. 解离: 将固定过的材料经 50% 酒精转入蒸馏水中, 然后投入已在恒温箱或水浴锅中预热 60℃ 的 1N 盐酸中, 在 60℃ 下解离 15~20 min。

d. 水洗: 解离过的根尖用蒸馏水换洗 3~4 次, 除净残留的盐酸, 否则影响染色。

e. 媒染: 水洗过的根尖浸入 4% 铁矾水溶液中, 媒染 10~24 h, 媒染时间宁长勿短。如放到保温箱内加温 30~40℃, 可缩短至 0.5~1 h。

- f. 水洗: 换水冲洗 4~5 次, 每次 5 min, 务必将残留的铁矾充分洗净。
- g. 染色: 用 0.5% 的苏木精染色液染色 0.5~1 h。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。
- h. 蓝化: 在自来水中洗 5~10 min, 染色材料变得黑蓝。
- i. 软化和分色: 将材料转入 45% 的醋酸中进行软化和分色, 注意要经常换掉旧液加新液, 约需 0.5~2 h, 退到除根端黑色外, 其余部分为白色时为止。
- j. 压片: 在 45% 醋酸中压片。
- k. 封片: 经镜检后找一染色体分散, 清晰的制片作成永久片。

3. 碱性品红与孚尔根染色压片法

碱性品红为一种混合的三苯甲烷类的碱性染料, 溶于水, 更易溶于乙醇。用碱性品红与偏重亚硫酸钠、盐酸配制成的染色液, 通常称做锡夫 (Schiff's) 试剂, 这种试剂遇醛类物质即呈紫红色, 可用于鉴定醛基的存在。1924 年, Feulgen 和 Rossenbeck 首先发现和确定 Schiff's 试剂能使核和染色体着色, 定性地鉴定细胞核内 DNA 的存在, 故用这种试剂进行的染色体染色, 称孚尔根染色法。其基本原理是细胞中的 DNA 经过温和的盐酸的水解作用后, 很快除掉 DNA 的嘌呤碱, 而使潜在的醛基游离, 当这些游离的醛基与脱色的碱性品红 (Schiff's 试剂) 反应时, 形成紫红色的化合物。这一反应, 关键是水解时间, 因核酸水解有两个过程: 第一, 去掉嘌呤碱, 露出 DNA 上的醛基; 第二, 去掉组蛋白和核酸。在短时间水解作用后第一进程占优势, 锡夫试剂染色作用最强; 水解作用继续进行, 第二过程逐渐占优势, 染色体中锡夫反应减弱, 最后停止。因此水解时间不能过长, 必须恰到好处。用此法染色后, 需用 SO_2 漂洗, 以除去附着于细胞中的残留染料。

这种方法的优点是, 仅对核及染色体中的 DNA 显色, 所以压片的颜色比较均匀一致, 细胞软化易于压片。但染色体柔软, 压片时较长的染色体容易相互纠缠而不易于分散, 而且由于 DNA 含量和处理条件不同, 显色差别很大, 有些材料处理不合适, 常常染不上颜色。

(1) 染色液 (锡夫试剂) 的配制 取 0.5 g 碱性品红, 慢慢加入煮沸的 100 mL 蒸馏水中搅和, 再煮 5 min, 待充分溶解后, 冷却至 50~58℃, 过滤于一棕色磨口瓶中, 待滤液冷却至 26℃, 再加入 10 mL 1N 盐酸和 0.5 g 偏重亚硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) 或偏重亚硫酸钾, 搅和, 塞紧瓶塞。用黑纸包好, 置于黑暗阴凉处或冰箱内 (4℃) 12~24 h 以后, 如溶液呈无色或淡茶色即可使用, 如有少许红色, 可加 0.5 g 活性炭过滤, 如经过滤仍然呈淡红色时, 则不能使用, 必须重配。此液密封在冰箱内 (5℃) 可保存 6 个月。

(2) 漂洗液配制

1N HCl	5 mL
10% 偏重亚硫酸钠水溶液	5 mL
蒸馏水	100 mL

(注意: ①染色液和漂洗液中的偏重亚硫酸钠或钾必须一致; ②此液用时新鲜配制)

(3) 染色制片步骤

- a. 取材固定: 截取 0.5 cm 长的根尖, 投入卡诺固定液固定 2~24 h。
- b. 水解: 将固定后的材料取出放在指形管内, 经 50% 酒精转入蒸馏水洗 2~3 次, 换入 1N 盐酸中解离 2~5 min, 倒掉, 换入已预热 60℃ 的 1N 盐酸, 置恒温水浴中在 60℃ ±

0.5℃下水解 10 min, 吸去热 HCl, 换冷 1NHCl, 在室温下 1~2 min。

c. 水洗: 用蒸馏水将材料彻底洗净, 换洗 3~4 次, 每次 2~3 min。

d. 染色: 倒进锡夫试剂, 盖紧盖子, 染色 1~5 h (室温下) 或过夜。

e. 漂洗: 在漂洗液中漂洗 3 次, 每次 5~10 min, 再用流水洗 10~15 min。

f. 保存: 存于蒸馏水中。

g. 压片: 在一滴 45% 醋酸中压片, 如材料染色较浅, 可在压片时加醋酸洋红。材料如观察不完, 可放入醋酸洋红中保存 (最多 2 周), 对不易染色的材料可起到加深染色效果的作用。

h. 封片: 在显微镜下检查具有有丝分裂典型各期的片子, 可作成永久封片。

(4) 注意事项

a. 配制锡夫试剂时, 需十分注意干净。试剂应放在黑暗处, 否则容易破坏。

b. 染色时易受温度的影响, 在 9~11℃ 时最活跃, 如室温高达 30~35℃ 时, 往往受影响。

c. 材料在 60℃ 1N 盐酸中处理时, 离解时间的长短因各种固定剂的不同及组织不一样而有差异。这步骤中最重要的是温度, 必须保持在 $60^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 过高会使 DNA 破坏, 而染不上色, 过低又不能达到离解的目的。

d. 所用的漂洗液必须新鲜配制, 如果溶液中失去 SO_2 刺激味即不能使用。

4. 石碳酸品红染色压片法

石碳酸品红染色液用碱性品红与石碳酸 (苯酚)、冰乙酸、甲醛和山梨醇等配制而成, 它是目前应用最为广泛的一种优良的核和染色体的染色剂, 它既具有醋酸洋红的染色简便、快速的特点, 又有孚尔根反应的分色清晰的优点。染色体被染成紫红色, 细胞质一般不着色, 视野中染色体醒目, 背景清晰, 不论大小染色体, 只要水解时间合适均能获得优良染色效果。此外, 染色剂的耐保存和稳定性以及制片后颜色的持久不褪色等优点, 都是前两种染色法所不及的。

(1) 石碳酸品红染色液的配制

a. 原液 A: 将 3g 碱性品红溶于 100 mL 70% 酒精中 (此液可以长期保存)。

b. 原液 B: 取 10 mL 原液 A 加入 90 mL 石碳酸 (苯酚) 水溶液中 (在 2 周内使用)。

c. 原液 C: 将 55 mL 原液 B 加 6 mL 冰醋酸, 再加 6 mL 37% 的甲醛。

d. 染色液: 取原液 C 2~10 mL 加 90~98 mL 45% 醋酸和 1.8 g 山梨醇, 此液刚配好时染色淡, 2 周后染色能力加强, 而且放置时间越久, 染色效果越好。在室温下存放, 2 年内染色液保持稳定。

(2) 染色制片步骤

a. 取材和预处理: 截取根尖投入对二氯苯饱和溶液中, 在室温下处理 10 h。

b. 固定: 用卡诺固定液固定 5~12 h。

c. 解离: 固定的根尖经 50% 酒精转入蒸馏水洗 2~3 次, 而后投入已预热 60℃ 的 1N 盐酸中解离 5~8 min (或在 0.1~0.2N 盐酸中解离 10 min)。解离时间长短是此法染色的关键, 应经过试验。

d. 水洗: 冲洗 4~5 次, 每次 3~4 min。