

北京林业大学自编教材

林木遗传学实验指导

(附各章思考题)

北京林业大学
林木遗传育种教研室

1994年6月

目 录

实验一	有丝分裂	1
实验二	减数分裂的涂片制作	4
实验三	减数分裂过程观察	7
实验四	永久片制作	10
实验五	等位基因分离的验证	12
实验六	分离定律和自由组合定律的验证	14
实验七	基因的连锁交换及定位	16
实验八	细胞核内脱氧核糖核酸(DNA)的鉴定	19
实验九	高等植物核 DNA 的提取和纯化	21
实验十	染色体结构的变异	24
实验十一	染色体数目的变异	25
实验十二	植物多倍体的诱发及鉴定	27
实验十三	植物染色体组型分析	29
实验十四	植物染色体带型分析	31
实验十五	显微摄影技术	35
实验十六	植物组织培养技术	39
附录 I	《林木遗传学基础》各章复习思考题	
附录 II	χ^2 值表	
附录 III	20 种氨基酸的遗传密码字典	
附录 IV	P—i—S 表	

实验一 有丝分裂

一、实验目的

学习醋酸洋红染色法和酶液解离染色法两种植物细胞有丝分裂的操作方法，观察植物根尖或茎尖分生细胞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。

二、实验原理

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，而其余大部分时间是处于细胞连续两次分裂之间的间期。有丝分裂时期染色体变化的特征简述如下：

前期：核内染色质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，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点相连，形成纺锤体。在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：各染色体着丝点分裂为二，其每条染色单体也相应地分开，并各自随着纺锤丝的收缩而移向两极，每组有一组染色体，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。这时细胞进入分裂间期。

间期：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，看不到染色体，只看到均匀一致的细胞核及其中许多的染色质。实质上间期的核是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材料。

可以用醋酸洋红染色和酶液解离染色两种方法操作。采用纤维素酶和果胶酶的混合酶液解离植物细胞，更便于观察染色体的形态特征和数目。

三、实验材料

蚕豆、洋槐、杨树等根尖或茎尖活体材料。

四、实验用具及药品

(一) 仪器用具 显微镜、酒精灯、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、水浴锅等。

(二) 药品试剂 无水酒精、95% 酒精、80% 酒精、70% 酒精、1N 盐酸、1% 醋酸洋红、

卡诺氏 (Carnoy's) 固定液 (1 份冰醋酸 + 3 份无水酒精)、铁矾 (硫酸亚铁)、秋水仙碱、对二氯苯、 α -溴萘、8-羟基喹啉、碱性品红、冰醋酸、苯酚、福尔马林、山梨醇、纤维素酶、果胶酶、0.1M 醋酸钠、改良苯酚品红染色液等。

(三) 试剂配制

1% 醋酸洋红染色液: 将 100ml 45% 醋酸加热煮沸后, 移去火苗, 徐徐加入 1—2g 洋红, 待全部溶解后再煮沸 1—2min, 冷却后加入 2% 的铁矾水溶液 5—10 滴, 或在煮沸醋酸洋红染色液中悬置数枚锈铁钉 (防止溶液溢出), 以增强染色性能。配制的染色液过滤后贮存于棕色试剂瓶中备用。

各种酒精浓度和不同当量浓度的酸碱溶液配制方法见附录 II。

0.01%—0.1% 秋水仙碱溶液: 先以少量 95% 酒精将 1g 秋水仙碱溶解, 再加蒸馏水至 100ml 配成 1% 的母液, 贮存于棕色瓶中, 置冰箱内保存。需要时则可量取一定量的母液, 按比例稀释即可。

对二氯苯饱和水溶液: 取 10g 对二氯苯加蒸馏水 100ml。

0.002M 的 8-羟基喹啉水溶液: 用分析天平称 0.2901g 8-羟基喹啉用蒸馏水定溶于 1000ml 容量瓶中, 在 60℃ 下溶解后备用。

0.1M 醋酸钠缓冲溶液 (pH4.5): 称取 2.95g 醋酸钠和 3.8ml 冰醋酸, 用蒸馏水定容至 1000ml。

酶液: 称 2g 纤维素酶和 0.5g 果胶酶溶于 100ml 0.1M 醋酸钠溶液中 (pH4.5), 配成 2% 纤维素酶和 0.5% 果胶酶的混合液。

改良苯酚品红染色液:

A 液: 称 3g 碱性品红, 溶于 100ml 70% 酒精中 (此液可长期保存)。

B 液: 量 10ml A 液, 加入 90ml 5% 苯酚水溶液中 (此液限 2 周内使用)。

量 45ml B 液, 加入 6ml 冰醋酸和 6ml 37% 福尔马林, 即制成苯酚品红染色液。

量 10ml 苯酚品红染色液, 加入 90ml 45% 醋酸和 1g 山梨醇; 即制成改良苯酚品红染色液 (山梨醇稍多, 会出现结晶, 影响制片效果)。

五、实验步骤

(一) 醋酸洋红染色法

1. 取材

选取蚕豆种子放在烧杯中, 加入少量热水搅动 1—2 分钟, 再倒进冷水使温度维持在 40—50℃ 左右, 静置过夜, 使种子充分吸涨后将水倒出, 用蒸馏水清洗, 然后捞出包在干净的双层湿纱布内, 置于 25℃ 条件下, 待种子开始萌动时取出, 使胚根外露处向下插入到盛有水洗过的湿锯沫搪磁盘中, 锯沫可堆放约 3—5cm 厚 (洋槐、小麦种子等可放在铺有吸水纸的培养皿内), 保持温湿条件继续培养。当胚根长到 1.5—3cm 时, 用水洗净备用 用时切取根尖端部 2—3mm 长即可。也可取杨树枝条扦插后培养出的根尖或茎尖材料。

2. 预处理 为了获得中期分裂相比较多的细胞, 使染色体缩短、分散, 便于压片观察, 对剪下的根尖可采用下列任一方法进行预处理。

(1) 冷冻处理 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, 然后把冰瓶放到 0—3℃ 的冰箱内处理 24h, 染色体数较多的实验材料可适当延长时间, 但需注意勿使材料结冰。

(2) 药剂处理 预处理常用的药剂及其处理时间为：

① 0.01—0.2%秋水仙碱水溶液处理2—4h。

② 对二氯苯饱和水溶液处理3—4h。

③ 100ml 对二氯苯饱和水溶液加1—2滴 α -溴萘处理3—4h。

④ 0.002M 8-羟基喹啉处理3—4h

用以上各种药剂处理时，应注意温度不能过高，以10—15℃为宜。

3. 固定 经过预处理的材料冲洗干净后，用卡诺氏固定液固定24h，经固定的材料若不立即使用，可置于95%酒精和80%酒精中各半小时，再换到70%酒精中，置于4℃下保存。如保存时间太长，需要重新固定后再用。

4. 解离 固定的材料换入蒸馏水中洗净，然后放入1N 盐酸溶液中，在60℃下解离6—20min，以便胞间层的果胶类物质解体，使细胞易于分散，便于压片。材料经解离后，用蒸馏水洗涤数次，将材料中的酸洗净，以便染色。

5. 染色 用吸水纸将洗净的材料吸干，放入盛有1%醋酸洋红染液的指形管中染色2—4h。若只作临时镜检观察，可直接将材料置于载玻片上，滴上1滴1%醋酸洋红染色后压片。

6. 制片 将盛有数条根尖和染色液的指形管用木夹夹住，在酒精灯上加热煮沸3—5次，使根尖软化着色。加热时要注意不断摇动试管，以防煮沸的染色液冲出试管。然后，把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1.5mm，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，再用铅笔的橡皮头垂直轻敲，敲时不要移动盖玻片。

7. 镜检 先用低倍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百分率，然后用高倍镜仔细观察各时期染色体的行为和特征。

(二) 酶液解离染色法

1. 取材 (同前)

2. 预处理 将根尖浸入0.002M 8-羟基喹啉溶液中，处理1—4h，水洗并经固定液固定后，保存于70%酒精中备用。

3. 酶处理 用0.1M 醋酸缓冲液洗根尖2次，转入2%纤维素酶液中，置于25℃温箱中处理1—2h，使根尖软化。

4. 酸处理 再经0.1M 醋酸缓冲液洗2次，在60℃水浴锅中，以0.1N 盐酸水解2min，然后用45%醋酸清洗。

5. 染色 取小段根尖放在洁净的载玻片上，滴数滴苯酚染色液，盖上盖玻片，用吸水纸吸干多余染色液，并以铅笔的橡皮头轻轻敲打，使细胞分散。

6. 镜检 (同前)

六、实验报告内容

1. 制作细胞有丝分裂各时期图象清晰的片子1—2张。

2. 对所观察到的细胞有丝分裂过程中各时期的图象进行绘图，并简要说明染色体的行为特征。

实验二 减数分裂的涂片制作

一、实验目的

学习花粉母细胞减数分裂的取材、固定和染色涂抹制片技术。

二、实验原理

观察植物的减数分裂，通常是以小孢子母细胞减数分裂为材料，也就是观察植物花粉的形成过程。每个小孢子母细胞经减数分裂（先后两次分裂）后，产生四个子细胞，每个子细胞（即小孢子）以后形成一个单核花粉。小孢子内细胞核的染色体数目减为一半，成为单倍体（ n ）。因此，只要在适当的时机采集植物的花蕾，经过固定处理，就可以进行涂片制作了。这种方法比较简易，制片后就可以在显微镜下观察到减数分裂过程。

三、实验材料

经过固定的玉米雄花穗或油松、银杏的花药。

四、实验药品和仪器

显微镜、解剖针、载玻片、盖玻片、纱布、吸水纸、镊子、培养皿、烧杯、量筒、冰醋酸、95%酒精、洋红、碱性品红、石炭酸。

五、实验方法和步骤

1. 准备工作

(1) 载玻片和盖玻片的清洗

载玻片和盖玻片用前在20%的盐酸酒精（95酒精100份，加盐酸2分）中浸泡几小时，取出后用流水冲洗干净，然后浸于95%酒精中备用。实验使用时用镊子夹出，再用干净纱布、滤纸擦干。

(2) 固定液的配制

卡诺氏（Carnoy's）固定液：用1份冰醋酸和3份无水乙醇配制而成。

(3) 染色剂的配制

①卡宝品红（Carbol fuchsin）或称石炭酸品红：这是国内目前应用比较广泛的一种优良的染色剂，配方如下：

原液 A：3克碱性品红（Basic fuchsin）溶于100毫升70%酒精中（此液可长期保存）。

原液 B：取原液 A 10毫升，加入90毫升5%的石炭酸（苯酚）水溶液中（只能保存二周）。

原液 C：取原液 B 55毫升，加入冰醋酸和甲醛6毫升（可长期保存）。

染色液：取原液 C 10~20毫升，加入45%乙酸80~90毫升，再加入1克山梨醇（sorbital）。

染色液配好后，放置1~2周后即可使用。一般可以保存两年。

②孚尔根（Feallgen）染色

这是 Rossonbeck 于1924年发明的,对 DNA 特异染色的一种组织化学方法。这种染色方法即可用于 DNA 含量的测定,也可作为染色体的一般染色。所用的染色剂是 Schiffs 染色剂。配制方法如下:

将0.5克碱性品红结晶溶于100毫升煮沸的蒸馏水中,不断搅动使充分溶解,待冷却至约58℃时,过滤于一棕色试剂瓶中。滤液继续冷却到23℃时再加入10毫升1N 盐酸和0.5克偏重亚硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$),不停摇动使溶解。配好的溶液静置于暗处12~24小时,视染色液变为透明无色或淡茶色即可使用。

2. 实验操作步骤

(1) 取材与固定

取材:观察植物的减数分裂,通常就是观察植物形成花粉的过程。由于不同种,不同地区的各种植物生长发育规律有着很大的差别。因此,取材时就不可能有统一的时间和标准。一般要在掌握所用材料生长节律和物候习性的基础上,适时正确的取材,才能获得理想实验材料。我们仅举油松、银杏和玉米为例。

银杏:银杏是雌雄异株,春天开花。但开花日期随当年气温变化常有一定变化。以北京地区为例,一般开花日期大致在三月中旬,即3月10日至3月20日。取材时应注意当年的气温,以决定采样日期。

从形态指标来看,应从3月上旬开始,注意观察雄球花的颜色,一俟由嫩绿开始向浅黄色转变时,就应及时采样检查和固定。或者待整个球花端部微微开裂时,便将雄球花枝剪下,放入室内水培,每日取样检查,一旦减数分裂开始便及时固定。固定后的材料应在1~2日内实验观察。若拖后使用不易获得理想结果。若要较长时间保存,则转至95%酒精中。

油松:北方各地油松花期在四月中旬。随年份不同稍有提前或推后。油松的雄球果聚集成簇,孢子囊成熟散粉时,球果呈黄色。采样则应在四月中旬以前。从四月初开始检查,待球果由绿泛黄时,及时采集整个球果固定待用。

玉米:玉米植株在喇叭口期前一周,(八月上中旬)即达至减数分裂期。这时用手指由喇叭口顺序向下捏挤叶鞘,至有松软感觉时,即是雄花序所在部位。用刀片纵向划一口,取出数条花序分枝进行检查。一般当小花苞长4~6毫米时,其花药可达2~3毫米,此时花粉母细胞分裂较多。取材时间以上午7~10时为宜,取材后立即固定。

固定:取好的材料要立即放入已经配好的卡诺溶液中,固定2~24小时。固定的目的是利用化学药品将生活细胞迅速杀死,以保持染色体的固有形态和结构。如果长期保存,通常将固定材料保存在70%酒精中,放冰箱内贮存。

(2) 染色制片

先将小花或玉米雄穗分枝置于培养皿内,加入少许固定液以防风干。然后用解剖针从小花内挑出花药2个,先置于吸水纸上,再放到载玻片上,加一滴染色液,注意切勿加多。用针头横切花粉,再轻压,挤出花粉母细胞,随即用镊子把所有药壁残渣捡除干净,以免妨碍观察。最后,用针轻轻捣散成堆的花粉母细胞。至此,便可在低倍镜下初步检查,如果发现有所要观察时期的细胞,则立即加上盖玻片。加盖玻片后轻轻加压,使其盖平,再用吸水纸吸去多余的染色液,并在酒精灯上烘烤一下。盖上玻片后就不要来回移动。

(3) 镜检和标记

染色制片完成后,便可及时镜检观察,先用低倍镜在较大范围内寻找理想分裂相的细

胞。盖片的边缘也不应忽视观察。一旦观察到良好的分裂细胞，则换高倍镜仔细观察。必要时用绘图细笔在细胞边加一小黑点，然后取下制片，在其反面的载玻片上黑点周围画一圆圈以作标记。至此，整个制片和观察过程便全部完成。

六、实验报告内容

1. 每人至少做出二张良好的制片，尽量找到中期 I 的分裂相，绘图描述染色体的数目。
2. 用文字简述单核小孢子与花粉母细胞的区分。

二、实验原理

植物细胞分裂的周期中，染色体在中期 I 排列在赤道板上，形态清晰，数目恒定，是观察染色体数目的最佳时期。因此，只要在适当的时期采集植物的花药，经固定、解离、漂洗、染色、制片等步骤，即可观察到中期 I 的分裂相。本实验以百合花药为材料，通过上述步骤，制作临时装片，在显微镜下观察，记录染色体数目的变化。

百合花药的采集与处理：百合花药在上午 8 时至 10 时采集，此时花粉母细胞正处于中期 I。采集后将花药放入 70% 酒精中固定 24 小时，然后转入 100% 酒精中脱水 24 小时。脱水后的花药经二甲苯透明，即可进行切片。

切片与染色：将脱水后的花药切成薄片，贴于载玻片上，经二甲苯透明后，浸入番红 A 染色液中染色 10 分钟。染色后的切片经 50% 酒精漂洗，即可进行制片。

制片与观察：将漂洗后的切片浸入 50% 酒精中，然后浸入 100% 酒精中，最后浸入二甲苯中。将切片取出，放在载玻片上，经二甲苯透明后，即可进行制片。制片后的切片在显微镜下观察，记录染色体数目的变化。

实验结果：通过观察，可以发现百合花药在中期 I 时，染色体排列在赤道板上，形态清晰，数目恒定。通过计数，可以确定百合花药的染色体数目为 24。

实验三 减数分裂过程观察

一、实验目的

观察了解植物花粉母细胞减数分裂各个时期染色体的变化特征。

二、实验原理

生物体在个体发育过程中,生长发育到一定阶段便进入性成熟时期,其主要标志是,性器官(植物中是花)中的性母细胞开始进行减数分裂,产生雌雄配子或性细胞。雌雄配子结合(即受精)后,成为受精卵或合子。在植物界中,则由合子发育成种子,然后通过种子逐渐长成新一代的个体。

减数分裂是生物在性母细胞成熟时配子形成过程中发生的一种特殊的有丝分裂。它包括连续两次的细胞分裂阶段:第一次分裂为染色体数目的减数分裂,第二次分裂为染色体数目的等数分裂。两次分裂可根据染色体变化特点分为前期、中期、后期和末期,由于第一次分裂的前期较长,染色体变化比较复杂,故其前期又可分为五个时期。在减数分裂的整个过程中,同源染色体之间发生联会、交换和分离,非同源染色体之间进行自由组合。最终分裂为染色体数目减半的四个子细胞,从而发育为雌性或雄性配子(n)。雌雄配子通过受精又结合成为合子,发育为新的个体,这样又恢复了原有的染色体数目($2n$)。由于不同雌雄配子染色体的重新组合,产生了大量的遗传变异,有利于生物的适应和进化。

生物性母细胞成熟时,减数分裂各时期染色体变化的特征简述如下:

第一次分裂:

前期 I: 可分为以下五个时期:

细线期: 核内染色体呈细长线状,互相缠绕,难以辨别成双的染色体。

偶线期: 同源染色体相互纵向靠拢配对,称为联会。这样联会的一对同源染色体,称为二价体。偶线期所表现的这一特征时间很短,一般较难观察到。

粗线期: 配对后的染色体逐渐缩短变粗,含有两条姐妹染色单体,这样一个二价体中就包含了四条染色单体,故又称为四合体。在此期间各同源染色体的非姐妹染色单体间可能发生片段交换。

双线期: 各对同源染色体开始分开,由于在粗线期非姐妹染色单体之间发生了交换,因而同源染色体在一定区段间出现交叉结。此期可清楚地观察到交叉现象。

终变期: 染色体更为浓缩粗短,交叉结向二价体的两端移动,核仁和核膜开始消失,此时各二价体分散在核内,适于计数染色体的数目。

中期 I: 核仁和核膜消失,所有二价体排列在赤道板两侧,细胞质里出现纺锤体、每个二价体的两条染色体的着丝点分别趋向纺锤体的两极,此时最适于计数染色体的数目和观察各染色体的形态特征。

后期 I: 二价体中的一对同源染色体开始分开,在纺锤体的作用下分别向两极移动,完成染色体数目的减半过程。此期,同源染色体的两个成员必然分离,非同源染色体间的各个

成员以同等机会随机结合，分别移向两极。注意此时染色体的着丝点尚未分裂，每条染色体含有两条染色单体。

末期Ⅰ：染色体移到二极。松开变细，核仁和核膜重新出现，形成两个子核。细胞质分裂，在赤道板处形成细胞板，成为二分体。

第二次分裂：

前期Ⅱ：染色体又开始明显缩短，而其包含的两条染色单体分得很开，只是着丝点仍然没有分裂。

中期Ⅱ：染色体整齐地排列在分裂细胞的赤道板上，出现纺锤丝。

后期Ⅱ：染色体的着丝点分裂为二，两条姐妹染色单体在纺锤丝的牵引下分别移向两极。

末期Ⅱ：染色体分到两极后，又重新出现核仁和核膜，同时细胞质分隔为二，从而使一个母细胞分裂成为四个子细胞，称为四分体或四分孢子。每个细胞内只含有原来母细胞的半数的染色体（ n ）。

减数分裂中染色体的行为变化与生物的遗传变异密切相关。既然染色体是遗传物质的载体，因此染色体在减数分裂中的行为对遗传物质的分配和重组产生了重大影响。高等植物的性母细胞（ $2n$ ）在形成雌雄配子（ n ）过程中必须通过减数分裂。由于植物花药取材容易，操作和鉴定比较方便，故一般都取用花粉母细胞作为制片材料，在光学显微镜下观察其减数分裂过程中染色体的行为变化。

三、实验材料

玉米的雄花穗和油松、白皮松等减数分裂永久制片。

四、实验用具及药品

1. 仪器用具 显微镜、酒精灯、培养皿、载玻片、盖玻片、镊子、刀片、木夹、吸水纸、标签纸、火柴。

2. 药品试剂 丙酸——水合氯醛——铁矾——苏木精染色液、卡诺氏固定液、95%酒精、80%酒精、70%酒精。

丙酸——水合氯醛——铁矾——苏木精染色液的配制：

A液：称2g苏木精溶于100ml 50%丙酸中。

B液：称0.5—1g铁矾溶于100ml 50%丙酸中。

将A液和B液按1:1比例混合，每5ml混合液中加2g水合氯醛，存放一天后使用。

五、实验步骤

1. 取材（参考实验二）

2. 制片 取1枚花药放在洁净的载玻片上，用清洁刀片压在花药上向一端抹去，涂成薄层，然后滴1滴苏木精染色液。也可在花药上滴上染色液，然后用镊子把花药镊碎，去掉肉眼见得到的残渣，数分钟后盖上盖玻片，包被吸水纸，用大拇指匀力压片，或用铅笔的橡皮头垂直轻敲。为了加深染色，可把载玻片平放在酒精灯火焰上来回摆动几次，使之略作加热。

3. 镜检 先在低倍镜下寻找花粉母细胞，一般花粉母细胞较大、圆形或扁圆形，细胞核大、着色较浅。而一些形状较小，整齐一致着色较深的细胞是药壁体细胞，一些形状处于

中间略呈扇形的是从四分体脱开后的小孢子或幼小花粉粒。如形状较大,内部较透明并具有明显外壳的细胞则是成熟的花粉粒。观察到有一定分裂相的花粉母细胞后,用高倍镜观察减数分裂各时期染色体的行为和特征。

六、实验报告内容

1. 制作减数分裂前期 I 图象清晰的片子 2—3 张。
2. 对所观察到的减数分裂各时期的图象进行绘图, 并简要描述染色体的行为和特征。

实验四 永久片制作

一、实验目的

学习掌握将根尖（或茎尖）细胞压片和花粉母细胞临时涂片改做成永久制片的制作方法。

二、实验原理

用植物根尖细胞压片或花粉母细胞涂抹制成的片子，如材料染色清晰、物象符合要求的，一般可用石蜡、甘油胶冻或指甲油将盖玻片的四周封固制成临时片，储于冰箱中，保存观察一周左右。但时间过长、物象收缩、颜色变深，将难以观察鉴别。因此，对一些需要长期保存的片子，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。其中材料脱水干净和透明良好是制好永久片的关键。为此，需选用适当的脱水剂和透明剂。目前较理想的脱水剂是正丁醇和叔丁醇，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，且能与封藏剂树胶混合，有利于封片，材料也不会发生收缩和硬化等问题。

三、实验材料

经镜检物象清晰的植物根尖、茎尖有丝分裂和花粉母细胞减数分裂的临时制片。

四、实验用具及药品

1. 仪器用具 显微镜、冰箱、培养皿、刀片、解剖针、镊子、玻璃棒、纱布、毛笔、吸水纸、标签。

2. 药品试剂 正丁醇、叔丁醇、95%酒精、冰醋酸、二甲苯、中性树胶。

五、实验步骤

（一）一般永久片制作方法

1. 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璃棒上，呈倾斜状，让盖玻片自然滑落。盖玻片脱落后2—3min，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。

2. 脱水、透明 取三只培养皿，分别编号②、③、④，在其中各放一根短粗玻璃棒，顺序加入下列脱水剂。

②2份95%酒精+1份正丁醇；

③1份95%酒精+2份正丁醇；

④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。

3. 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，使其气泡逸出。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保存，并贴上标签，注明标本名称、作者姓名和制片日期。

(二) 叔丁醇法 将编号的四只培养皿顺序加入下列脱水剂。

1. 1份45%冰醋酸+1份95%乙醇；
2. 95%丁醇；
3. 1份95%乙醇+1份叔丁醇；
4. 叔乙醇。

其它制片操作方法与上述的一般永久制片法相同。

六、实验报告内容

1. 制作清洁完整的有丝分裂和减数分裂的永久片各2张。
2. 镜检观察各制片的分裂相，进行绘图；简要描述各分裂时期的染色体行为和特征。

实验五 等位基因分离的验证

一、实验目的。

通过观察非糯性和糯性玉米杂种 F_1 的花粉染色试验, 验证减数分裂中等位基因的分离现象。

二、实验原理

植物成熟分裂(减数分裂)的结果是形成配子。在分裂过程中, 同源染色体上的等位基因将随着染色体的分离而分离。这样成对的等位基因就分别进入到不同的孢子中, 进而形成不同的配子。杂交试验中, 亲本双方的相对性状如果受到一对基因控制, 且具有显隐性关系, 那么所获得的杂交 F_1 代, 再进行减数分裂时, 雌雄个体(或雌雄花)将各会产生携带有不同基因的两种配子。一般来说, 直接观察 F_1 代形成配子时基因的分离, 是难以做到的, 但是雌雄配子体即花粉粒的性状是可以直接观察的, 因此, 通过观察不同性状的花粉的分离, 则可以证明等位基因在形成配子过程中, 确实发生了分离。

研究得知, 水稻、玉米等作物种子的胚乳有糯性和非糯性两种。它们是受一对等位基因控制的。在玉米中, 这对等位基因位于第九染色体上。非糯(W_x)对糯性(w_x)为显性。分析表明, 表现非糯性是由于含有直链淀粉, 糯性是含有支链淀粉。植物体中大多数细胞都含有淀粉粒。在配子体——花粉中也含有淀粉粒。如果把非糯玉米与糯性玉米自交系杂交, 那么所得杂种 F_1 代($W_x w_x$)在配子体形成过程中, 由于等位基因的分离, 使所产生花粉有的含非糯基因 W_x , 有的含糯性基因 w_x 。含非糯基因的花粉粒中产生直链淀粉, 遇到碘液呈蓝色; 含糯性基因的花粉中产生支链淀粉, 遇碘液呈棕色。如果这种 F_1 代的花粉是足够多的话, 就会看到被碘液染色的两种花粉粒数量大致相等, 即比例为1:1。可以说这是等位基因分离的一个比较直接的证据。

减数分裂中等位基因的分离, 是杂种的后代性状分离的原因, 也是自由组合的前提。

三、实验材料

本实验观察的材料是非糯玉米和糯性玉米杂种 F_1 的花粉。这种材料的得来, 应做如下说明。

所需要的杂种 F_1 的获得, 需要经过两年, 而且应该备有非糯玉米和糯性玉米的自交纯系。第一年, 将这两个自交系杂交。这将经过人工杂交的各种程序。于当年秋, 收获杂种玉米。待第二年, 将所获得杂种玉米(F_1)再专门种植, 并注意一定要适时套袋。一般据经验观察, 在撒粉前一大套袋为宜。第二日晨将盛开的雄花上的花粉抖落、收集, 储存于干冷处待用。另外, 亦可将减数分裂已完成, 但并未开放的雄花序剪掉, 放入卡诺固定液中长期保存备用。

四、实验仪器及用品

显微镜、电子计算器、载玻片、盖玻片、烧杯、培养皿、皮头玻棒、碘、碘化钾、镊子、解剖针、吸水纸。

五、实验方法与步骤

1. 试剂配制

1% I-KI (碘-碘化钾) 溶液的配制:

取2克碘化钾溶于5毫升蒸馏水中, 加入1克碘; 待其溶解后再加入295毫升水, 保存于棕色瓶中。

2. 花粉粒染色

挑出少量花粉或固定液中的一个花药, 置于载玻片上。挤破花药、使花粉散出, 挑出药壁等杂物。未染色前, 在显微镜下观察可见乳白色明亮的花粉粒。注意调节反光镜, 以稍暗一点为宜。然后, 滴一小滴 I-KI 溶液, 盖上盖玻片, 在镜下观察, 很快就可见有的花粉粒染成蓝黑色, 有的花粉粒染成棕黄色。以此便可分辨含有非糯基因 W_1 和糯性基因 w_1 两种不同的花粉粒。

3. 镜检计数

先用低倍镜观察, 然后再用高倍镜 (200倍左右) 计数, 每个玻片观察5个视野, 分别记录两种花粉粒的数量。

镜检时应注意: (1) 解剖用具如针、镊子要保持洁净, 每次使用后要投入水中, 洗去粘着的花粉, 以免混染干扰检查结果。(2) 调节反光镜, 不用强光及直射光。调节光栏, 直至两种花粉的颜色明显可辨。(3) 观察计数要准确。凡畸形瘪皱、特小、发育不良的花粉粒均不计数。

4. 适合性测验

用 χ^2 法测验实际分离的比例是否与理论预期的比例 (1:1) 相符。测得数据填入下表, 然后按公式进行计算。

玉米非糯与糯性杂种 F_1 花粉分离的 χ^2 测验

花粉粒颜色	观察数 o	理论数 (1:1) c	偏差 $d=o-c$	差方 $d^2=(o-c)^2$	差方/理论数 $d^2/c=(o-c)^2/c$
深蓝色					
棕黄色					

自由度 $df=N-1=$

$$\chi^2 \text{ 值 } \chi^2 = \sum \frac{d^2}{c} =$$

计算出 χ^2 值后, 去查 χ^2 值表得到 P, 如果 $P < 0.05$ 则表示实验所得的实际结果, 偏离预期理论比例 (1:1) 显著, 从而可以推翻预期理论或假设。如果 $P > 0.05$ 则表示预期理论或假设是正确的。本试验所要测验的是两种不同的花粉粒分离比例是否符合基因分离的原则。

六、实验报告内容

- 每人镜检不同染色的花粉粒不少于200个。综合本组或全班的镜检结果, 做 χ^2 测验。
- 简单分析实验结果, 总结实验操作中的体会。

实验六 分离定律和自由组合定律的验证

一、实验目的

1. 通过一对相对性状玉米杂种的自交、测交后代性状分离现象，验证分离律的存在。
2. 通过两对相对性状杂种F₁的自交、测交后代性状分离现象，验证自由组合律的存在。

二、实验原理

杂种F₁代在形成雌雄配子时，控制一对相对性状的等位基因，发生分离。这一对性状如具有显隐性关系，形成的雌雄配子分别各有两种，且理论上数量是相等的。当F₁自交时各种雌雄配子结合的机会都是均等的。因此F₂代中就应该有三种基因型，它们的比例为1:2:1。但是我们所看见的表现型只有两种，比例是3:1。如果同源染色体上等位基因在减数分裂时分离现象得以确认，那么F₂代的这两种比例是毫无疑问的。同样，如果F₁与隐性亲本进行测交，则测交后代的基因型和表型比例均为1:1，其中的道理是显而易见的，上述两种情况下两表中可以得到证实。

F₁代自交后代基因型

♀ \ ♂	A	a
A	AA	Aa
a	Aa	aa

基因型：1AA:2Aa:1aa

表型：3 : 1

F₂代测交后代基因型

♀ \ ♂	A	a
a	Aa	aa
a	Aa	aa

基因型：2Aa:2aa

表型：1 : 1

以上我们考虑的是位于同源染色体上一对等位基因的情况。如果考虑位于非同源染色体上的两对等位基因，则F₁代减数分裂时会出现自由组合的现象。即基因随着所在同源染色体，在各自独立分离的基础上，在形成配子时

自由组合起来，从而形成各种可能组合的配子。如果将两对相对性状具有差异的亲本进行杂交，在F₂代或测交后代中就可以看到规律性的分离比例。当然，这两对相对性状是受两对基因控制，都有显隐关系，又分别存在于两对染色体上。这样，双亲杂交的F₁代，将产生4种不同的配子，理论上数量相等。它们自交得到的F₂代，应有9种基因型，4种表现型，比例是9:3:3:1。F₁代与双隐性亲本测交，后代基因型、表型的分离均为1:1:1:1。见下二图表。

F₁代自交后代的基因型

♀ \ ♂	AB	Ab	aB	ab
AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

F₁代测交后代基因型

$\begin{array}{c} \nearrow \\ \circ + \\ \circ \end{array}$	AB	Ab	aB	ab
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

三、实验材料

四、实验用品

五、实验方法及步骤

1. 观察一对性状有差异的杂种自交及测交后代分离情况。每人分别计数一个自交后代果穗和一个测交后代果穗。然后用 χ^2 法测验是否符合分离律。
2. 观察二对性状有差异的杂种自交及测交后代分离情况。计数、记录、 χ^2 测验

六、实验报告内容

将计数、记录结果填入记录表内，可以汇总本组或本班的记录，每人各自做 χ^2 测验，并做扼要讨论。

表型性状的遗传分析 (χ^2 测验)

表 现 型	显性纯合子 (AA)	杂合子 (Aa)	隐性纯合子 (aa)	合计
观察数 (o)	16	24	10	50
预期数 (e)	16	24	10	50
偏差 (d = o - e)	0	0	0	0
差方 $[d^2 = (o - e)^2]$	0	0	0	0
$\frac{(o - e)^2}{e} = \frac{d^2}{e}$	0	0	0	0

自由度 = $N - 1$

$$x^2 = \sum \frac{d^2}{e} =$$

$P =$