

目 录

第一章 植物染色体组型分析	1
一、染色体的形态和结构	1
(一)染色体的超微结构	1
(二)染色体的纵向分化	4
二、有丝分裂过程中染色体的行为	7
(一)细胞周期中染色体的动态	7
(二)有丝分裂过程中染色体的动态	7
三、有丝分裂染色体标本的制备	9
四、植物染色体标本制备的新技术	13
(一)去壁低渗火焰干燥法的步骤	14
(二)去壁低渗火焰干燥法中几个主要因素的分析	14
五、染色体组型分析	15
(一)组型分析的形态指标及其标准	16
(二)组型图、组型模式图及组型公式	18
六、几种植物染色体标本制备实验	19
七、几种植物的染色体组型分析实验	21
参考文献	22
第二章 植物染色体带型分析	24
一、染色体分带研究概况	24
(一)简史	24
(二)植物染色体分带技术的应用	25
二、植物染色体Q分带技术	26
(一)喹啉因(quinacrine)处理法	26
(二)Hoechst 33258溶液处理法	26
(三)植物染色体的荧光带	27
三、植物染色体C分带技术	28

(一) BSG法的程序	28
(二) 影响带纹显示的几个因素	29
四、植物染色体N分带技术	29
(一) NaH_2PO_4 法	30
(二) 三氯醋酸-HCl法	30
(三) N带在染色体上的位置	30
五、植物染色体银染技术	31
六、植物染色体G分带技术	32
七、植物姐妹染色单体区分染色技术	34
(一) FPG法	35
(二) Brdu-Giemsa法	35
(三) 姐妹染色单体区分染色的应用	37
八、植物染色体带型分析	37
九、染色体显带机制	39
(一) Q带形成的机制	39
(二) G带、C带形成的机制	41
十、几种常见作物染色体分带实验	44
参考文献	45
第三章 植物染色体组分析	48
一、减数分裂中染色体的行为	48
(一) 两种分裂方式的比较	48
(二) 减数分裂各时期的特征	43
二、染色体组分析	55
(一) 染色体基数和染色体组	55
(二) 异源多倍体染色体组来源的分析	59
(三) 异源多倍体的染色体组间关系的分析	62
(四) 同源染色体配对的控制机制	64
三、减数分裂染色体标本的制备	67
(一) 减数分裂材料的取得	67
(二) 制片方法	68
四、黑麦花粉母细胞减数分裂观察实验	69

五、小麦染色体组分析实验	70
参考文献	71
第四章 植物染色体变异的诱发、鉴定和应用	73
一、染色体结构变异的诱发和鉴别	73
(一) 诱发染色体结构变异的原理与方法	73
(二) 染色体结构变异的细胞学鉴别	79
二、多倍体的诱发和细胞学鉴定	84
(一) 诱导多倍体在植物育种上的应用	84
(二) 诱导多倍体的方法与原理	85
(三) 多倍体的细胞学鉴定	90
三、非整倍体的产生和染色体工程	90
(一) 染色体的削减	90
(二) 染色体的添加	93
(三) 染色体的代换	95
四、人工诱发植物染色体结构变异的实验	98
五、人工诱发几种作物多倍体的实验	99
六、小麦单体的细胞学鉴定实验	100
参考文献	102
第五章 植物染色体DNA的原位杂交和基因定位	103
一、研究概况	103
二、基本原理及步骤	105
三、放射性探针的制备	106
(一) 体内标记rRNA的方法	106
(二) 体外制备放射性cRNA的方法	106
(三) rDNA的末端标记法	108
(四) 放射性DNA探针的缺口平移法	109
四、生物素标记探针的制备	109
(一) 生物素标记探针的优点	109
(二) 原理和方法	110
五、小麦染色体上高度重复顺序的定位实验	111

六、制备快速复性黑麦DNA放射性探针的实验	114
参考文献	116
第六章 植物体细胞遗传学与细胞培养	118
一、植物体细胞遗传学的兴起和发展	118
(一) 历史的回顾	118
(二) 植物体细胞遗传学的建立	119
二、培养的植物细胞进行遗传操作的困难	122
三、植物组织和细胞培养概况	125
(一) 简要历史	125
(二) 名词和术语	128
四、植物组织培养的实验室	129
(一) 一般要求	129
(二) 器皿洗涤	130
(三) 培养基制备	131
(四) 消毒	131
(五) 无菌室及无菌操作	133
(六) 培养室及常用培养器皿	134
五、植物细胞培养的营养要求和培养基	135
(一) 培养基的组成	135
(二) 培养基的制备方法	139
参考文献	141
第七章 植物组织培养技术	142
一、愈伤组织的诱导及培养	142
(一) 外植体	142
(二) 培养基和培养条件	144
(三) 愈伤组织的形成及继代培养	144
二、禾本科胚性愈伤组织的诱导和培养	145
(一) 外植体的选择	146
(二) 胚性愈伤组织的诱导	146
(三) 胚性愈伤组织的保持和培养	148
三、胡萝卜愈伤组织的诱导及培养实验	149

四、烟草愈伤组织的诱导和激素对形态建成的作用	151
五、茎尖培养技术	154
附 马铃薯茎尖培养方法	155
参考文献	157
第八章 植物细胞培养技术	158
一、悬浮细胞培养	158
(一) 悬浮培养细胞的诱导	158
(二) 继代培养——悬浮培养物的保持	159
(三) 悬浮培养细胞的生长及测定	160
二、悬浮培养细胞的同步化方法	163
(一) 物理方法	164
(二) 化学方法	165
三、细胞的植板技术	168
(一) 平板培养技术	168
(二) 饲养层培养技术	168
(三) 双层滤纸植板技术	170
四、植物细胞的大规模培养	171
(一) 培养植物细胞的特点	172
(二) 基本步骤	173
五、植物细胞的固定化技术	173
(一) 意义	173
(二) 固定化细胞反应器	175
(三) 植物细胞的几种固定化方法	176
六、植物细胞悬浮培养实验	179
七、低温和饥饿处理诱导悬浮培养细胞同步化实验	180
参考文献	182
第九章 花药及花粉培养	184
一、花粉发育途径	184
二、花药培养	187
(一) 一般程序	187

(二) 培养基	188
三、花粉培养	192
(一) 花粉培养的优点	192
(二) 花粉培养研究概况	193
(三) 花粉培养的方法	194
四、影响雄核发育的因子	197
(一) 供体植物的基因型影响	198
(二) 植株的生理状态	199
(三) 花粉的发育时期	199
(四) 冷处理的效应	200
五、花药培养中的白化苗	200
(一) 供体植物的基因组成	201
(二) 花粉发育时期的影响	201
(三) 花药培养时的诱导条件	202
六、花粉植株的应用	204
(一) 纯系的生产和应用	204
(二) 获得染色体附加系和代换系	205
七、烟草花药培养实验(方法之一)	206
八、烟草花药培养实验(方法之二)——预处理和 漂浮培养法	208
九、小麦花药培养实验——马铃薯简化培养基的应用	209
参考文献	210
第十章 胚胎培养及体外受精	212
一、离体胚培养	212
(一) 胚离体培养的意义和应用	213
(二) 胚培养的一般方法	215
(三) 胚培养的营养需要及培养条件	217
二、胚珠培养	219
(一) 引言	219
(二) 培养的一般方法	220
(三) 培养胚珠的发育	220

三、子房培养	222
(一)子房培养的一般程序.....	222
(二)培养子房的发育及应用.....	222
四、胚乳培养	224
(一)概况.....	224
(二)胚乳培养的一般方法.....	224
(三)胚乳培养的应用.....	229
五、植物的离体授粉和受精	230
(一)试管受精概念.....	230
(二)试管受精方法.....	231
六、未授粉子房离体培养诱导单倍体植物实验	234
七、烟草胚珠试管受精实验	236
参考文献	238
第十一章 植物原生质体的分离、培养和融合	241
一、植物原生质体是体细胞遗传学研究的重要实验系统	241
二、植物原生质体的分离	242
(一)材料来源.....	243
(二)原生质体分离方法.....	245
三、植物原生质体培养	248
(一)原生质体的培养基.....	248
(二)培养方法.....	249
(三)影响原生质体培养的几个因素.....	252
(四)原生质体的发育和植株再生.....	253
四、植物原生质体融合	256
(一)体细胞杂种植物.....	256
(二)融合的方法和技术.....	260
(三)原生质体的融合产物.....	262
(四)杂种细胞的筛选.....	264
(五)细胞杂种的鉴定.....	268
五、叶肉原生质体的分离和培养实验	269
六、从悬浮培养的细胞中分离原生质体	272

附一 植物原生质体的活力测定	274
附二 植物原生质体细胞壁再生的荧光观察	275
七、植物原生质体的融合实验 (PEG法)	276
参考文献	278

第十二章 体细胞无性系变异及突变体筛选

一、体细胞无性系变异的广泛性	281
二、体细胞无性系变异的机理	284
(一) 染色体变异	284
(二) DNA 扩增	285
(三) 转位因子	286
三、植物细胞突变体概述	287
(一) 细胞突变体的概念	287
(二) 细胞突变体的类型	287
四、细胞突变体的诱发和筛选	290
(一) 材料的选择	290
(二) 细胞来源	291
(三) 突变的诱发	292
(四) 突变体的选择和鉴定	294
五、细胞突变体的利用	236
(一) 生化代谢途径的研究	296
(二) 植物细胞遗传操作中的选择标志	297
(三) 基因突变位点的分析	297
(四) 筛选有益突变为作物改良服务	298
六、突变体筛选实验——化学诱变剂的应用	198
参考文献	302

第十三章 细胞器的分离和移植

一、植物的细胞器及其相互作用	305
(一) 核基因组	305
(二) 叶绿体遗传系统	306
(三) 线粒体基因组	308
二、细胞器移植	309

(一) 细胞器移植的意义	309
(二) 细胞器移植的原理和方法	311
(三) 细胞器移植研究概况	312
三、叶绿体的分离	314
(一) 机械分离法	315
(二) 从原生质体中分离叶绿体的方法	317
附、植物叶绿体的分离和制备实验	318
四、植物细胞核的分离	319
方法一、组织匀浆法分离细胞核	320
方法二、从原生质体制备细胞核	321
五、染色体的分离方法	323
(一) 研究染色体分离的意义	323
(二) 植物染色体分离方法	323
(三) 异源染色体的摄取	325
参考文献	325
第十四章 植物的肿瘤发生	328
一、冠瘿瘤特征及研究概述	328
(一) 冠瘿瘤的特征	328
(二) 冠瘿瘤研究的历史	330
(三) 遗传性寄生	332
二、Ti质粒及T-DNA的结构和功能	333
(一) Ti质粒的基本性质	333
(二) T-DNA的结构和功能	335
三、Ti质粒作为植物基因转移的载体	340
(一) 外源基因在植物细胞中的转移和表达	340
(二) 含有外源基因的植株再生	342
四、植物冠瘿瘤的诱导实验	344
五、利用胡萝卜圆片诱发冠瘿瘤和发根瘤	346
六、冠瘿瘤组织的测定方法	349
参考文献	350
第十五章 植物细胞的转化	352

一、早期的植物转化研究	352
(一) 植物细胞转化的概念	352
(二) 高等植物早期的转化研究	353
二、农杆菌作为基因转移的载体	354
(一) 整体和离体组织水平的转化	355
(二) 原生质体再生细胞和农杆菌共培养转化	357
(三) 原生质体和农杆菌球质体融合转化	359
三、DNA介导转移基因	360
(一) Ti质粒DNA转化植物原生质体	360
(二) 直接基因转移	361
(三) 电激法转化	362
四、CaMV作载体的转化系统	364
(一) CaMV的基因组	364
(二) CaMV作载体转化植物原生质体	366
五、脂质体作载体的转化系统	367
(一) 脂质体的基本性质	367
(二) 脂质体与细胞的相互作用	366
(三) 脂质体作载体转化植物原生质体	366
六、微注射法转化	370
七、植物细胞转化系统小结	372
八、用根癌农杆菌转化植物细胞实验方法	373
九、Ti质粒DNA转化植物原生质体实验方法	377
附 农杆菌Ti质粒DNA的分离及纯化	381
十、农杆菌球质体转化植物原生质体实验方法	384
参考文献	387

第十六章 植物同工酶分析和电泳技术

一、同工酶技术的原理和方法	391
(一) 同工酶的概念及其应用	391
(二) 同工酶分析的原理和方法	392
二、植物可溶性蛋白的分离和同工酶测定	394
三、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定植物蛋白质的分子量	

.....	399
参考文献	404
第十七章 植物生物大分子的分离、纯化及分析	406
一、从植物材料中分离总DNA及其测定	406
二、从植物组织分离DNA——应用凝胶层析法	411
三、微量植物DNA的快速分离方法	413
附1.从植物原生质体分离DNA的方法	415
附2.从愈伤组织提取DNA	416
四、植物DNA的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析	417
五、核外基因组——叶绿体DNA的分离及纯化	419
六、核外基因组——线粒体DNA的分离及纯化	423
七、DNA的琼脂糖凝胶电泳分析	426
八、高等植物mRNA的分离与纯化	429
附 紫外吸收法测定核酸含量	432
九、细菌质粒DNA的分离方法	434
十、DNA的分子杂交 (Southern blot hybridization 法)	439
参考文献	452
第十八章 显微分光光度技术	454
一、细胞吸收光度技术的原理和方法	454
(一) 双波长法	455
(二) 一波两区法	456
(三) 扫描积分法	457
二、显微分光光度计的主要组件和构成	458
(一) 光源	458
(二) 光调制器	460
(三) 单色仪	460
(四) 显微镜	460
(五) 光电组合件	460
三、吸收光度计样品制备	461

四、染色体显带的自动光度分析实验	463
参考文献	466
第十九章 植物细胞的电镜技术	467
一、透射电镜的成像原理和结构	467
二、透射电镜样品的制备技术	470
(一) 支持膜的制备	470
(二) 超薄切片法	471
(三) 其它方法	473
三、扫描电镜的成像原理及结构	475
四、扫描电镜样品制备方法	476
五、扫描电镜一般生物样品制备实验	478
六、超薄切片制样技术实验	479
七、核酸大分子制样技术实验	484
参考文献	485
第二十章 放射自显影技术	487
一、放射自显影的基本原理	488
(一) 放射性同位素及其衰变规律	488
(二) 乳胶对射线的反应原理及乳胶的选择	490
(三) 自显影的分辨率及效率	491
二、放射自显影技术	492
(一) 试验材料的标记和标本的制备	492
(二) 乳胶膜的制备和曝光	493
(三) 显影和定影	494
(四) 自显影样品的观察与分析	495
(五) 去除放射性污染及废物处理	497
三、植物染色体的放射自显影实验	497
参考文献	499
附录	504
附录一、玻璃仪器的洗涤和各种洗液的配制	504
附录二、器具和溶液的灭菌方法	507

附录三、常用缓冲液的配制方法	517
附录四 聚丙烯酰胺凝胶电泳区带染色法	518
1. 蛋白质染色法	518
2. 核酸染色法	518
3. 常用同工酶染色法	519
附录五 常用药品及其主要性质	521
1. 常用酸碱	521
2. 常用有机溶剂	522
3. pH指示剂	523
4. 抑制剂	525
5. 生物染料	527
6. 维生素	529
附录六 各种内源激素和人工合成的生长调节物	530
附录七 植物原生质体分离常用的酶制剂	532
附录八 常用培养基	532
附录九 离心力g与离心机转速 rpm的换算	536

第一章 植物染色体组型分析

染色体是遗传物质的载体，生物的遗传、变异、繁殖、发育都和染色体的结构与行为有密切联系。鉴别染色体的最基本的技术就是染色体组型分析。

一、染色体的形态和结构

众所周知，染色体只有在细胞分裂时才能在光镜下见到，因为它是一种不断运动着的结构，在细胞间期它以染色质的形态存在。分裂中期染色体的形态特征最为典型，它由两条染色单体组成。染色体的一定部位有着丝粒，它把染色体分成两个臂。有些染色体臂上还有副缢痕和随体。这些形态结构都是鉴别染色体的重要指标。近年来研究者们已从超微水平和分子水平上对染色体的形态结构进行了深入研究。

（一）染色体的超微结构

在电镜下可见到真核生物染色体是由一条折叠卷曲的纤维丝状物质组成，在不同的细胞周期中，纤维丝直径不同。

间期染色体处于伸展状态，纤维丝直径最小，染色体以染色质的形式存在。染色质是由DNA、组蛋白、非组蛋白及RNA四种大分子组成。分析豌豆芽的染色质，DNA占40.0%，组蛋白占52.0%，其它蛋白占4.0%，RNA占4.0%。在豌豆胚轴的染色质中，DNA占39.0%，组蛋白占40.0%，其它蛋白占11.0%，RNA占10.0%。可见染色质的基本结构物质是DNA与组蛋白。DNA双螺旋的直径为2nm，与组蛋白结合后形成直径为10nm左右的染色质纤维丝。组蛋白是富含赖氨酸与精氨酸的碱性蛋白，分子量10,000—20,000D，约分五类，分别命名为H₁、H_{2A}、H_{2B}、

H₃、H₄，各有不同的氨基酸顺序，除H₁以外，组蛋白N端区域大多为碱性氨基酸，净电荷(+)多，C端大多为疏水性氨基酸。DNA的骨架由磷酸与脱氧核糖交替组成，带大量负电荷。组蛋白以N端区域与DNA链的负电荷结合，以C端区域与其他组蛋白、非组蛋白结合。Kornberg等(1974)证明染色质由许多核小体(nucleosome)串联而成。Finch等(1977)认为每个核小体含有一个由H_{2A}、H_{2B}、H₃、H₄各两个分子所组成的八聚体核心，外面绕以140碱基对的DNA(1.75圈)。DNA链继续延伸约20—100碱基对，称DNA连接丝，然后再盘绕在另一个组蛋白八聚体核心外，如此不断重复而串联成染色质纤维丝。核小体沿其短轴又可分为对称的两半，每半个称为半核小体，它是H_{2A}、H_{2B}、H₃、H₄各一个分子的四聚体，两个半核小体的连接是通过与A₂₄蛋白相结合的非组蛋白与DNA的联系。研究者们认为组蛋白H₁在联结核小体中起重要作用。每一个H₁分子约含二百多个氨基酸，它有一个类球状的中心区，中心区伸出两臂，一臂为N端区，另一臂是C端区。有些研究者认为H₁与DNA连接丝相结合构成连结区。另一些研究者认为中心区与核小体的特定部位结合，伸出的C端臂与邻近核小体上H₁的中心区结合，从而把许多核小体紧紧地连结成一串(图1-1)。

现在要问：直径约为10nm的核小体纤维丝如何形成电镜下常见的30nm纤维丝呢？现有两种不同的模型。第一种模型显示出一长串核小体螺旋化，每一个螺旋圈由6个核小体组成，这样可使10nm纤维丝缩短6—12.5倍，形成螺旋管(solenoid)。第二种模型认为：前后两个核小体是错开排列，第1、3、5……核小体呈一排，第2、4、6……呈另一排，并排两行的直径也近似30nm，如图1-3所示。

30nm纤维丝又怎样进一步缩短加粗呢？Bak等认为螺旋管再螺旋化可使纤维丝绕成直径为200—600nm的超螺旋体(super-solenoid)，从而又缩短10—40倍。再进一步螺旋化即是染色单

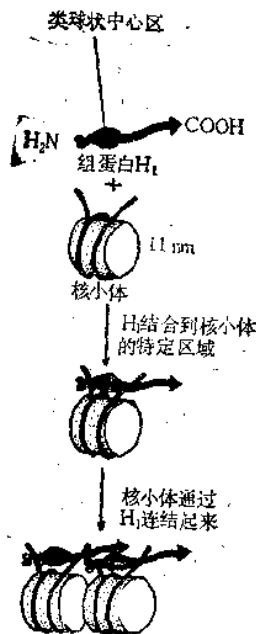


图1-1 H₁连接相邻核小体的示意图

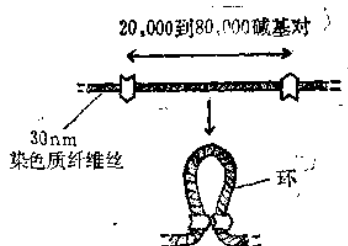


图1-2 30 nm纤维折叠成环的示意图

体。但是另有一些学者认为30 nm纤维丝缩短加粗过程中除螺旋化外还包括折叠成环(100 p)的过程(图1-2, 3)。现在多数研究者认为纤维丝螺旋化或折叠过程中H₁的磷酸化始终起着重要作用。

植物界中黄花延龄草(*Trilium luteum*)染色体最大, 每

条染色单体中DNA有 1.3×10^{10} bp。在间期伸展状态下长达1 m以上, 但在高度卷曲折叠的细胞分裂中期平均长度只有20 μm, 不及伸展状态的五万分之一长。这种近万倍的压缩率就是通过有规律地在螺旋上再形成螺旋, 可能还包括某些折叠, 使直径逐级增加, 长度逐级缩短。

值得提出的是Laemmli (1977) 用硫酸葡萄糖和肝素处理Hela细胞中期染色体, 把组蛋白去掉后, 在电镜下仍能看到一个维持中期染色体基本形状的支架。支架上布满了许多DNA环, 环长30—90 kb, 环上未见超螺旋结构。支架由非组蛋白构成, 电泳后显示出30多条清晰的非组蛋白带。Laemmli认为非组蛋白对中期染色体结构起稳定作用。Mathew等也证实了核小体含有非组蛋白, 非组蛋白中HMG₁、HMG₂参与维持染色质高级结构。

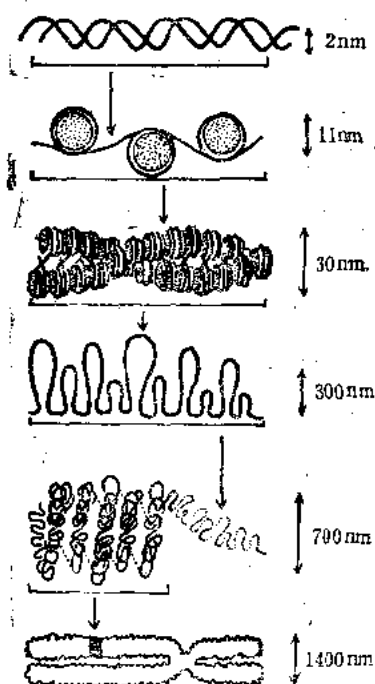


图1-3 从纤维丝逐级折叠和螺旋化成为染色体的示意图

非组蛋白在染色体结构形成中的作用是值得进一步研究的。

(二) 染色体的纵向分化

中期染色体具有典型而稳定的外型特征，宜识别染色体的个体性和进行组型分析。染色体外形呈棒状，沿着纵向有明显的分化。

1. 着丝粒 每条染色体均有一个固定位置的着丝粒 (centromere)。有丝分裂中期着丝粒部位表现出染色体直径稍有收缩，故有初级缢痕之称。着丝粒区对核染料不易着色，染色体易在这里弯曲，是形态特征的重要

指标。着丝粒的功能在于与纺锤丝连接，在染色体移动中担负重要责任。

着丝粒的结构，在动物染色体中常呈盘状，并分2—3层，是一种蛋白体，染色质纤维丝贯穿在内层。显花植物染色体在初级缢痕区只有球状的轮廓，无明显层次结构，纺锤丝是直接插入纠缠在一起的染色质纤维丝团里。早期Lima-de-Faria (1956) 曾提出了植物着丝粒结构模型，迄今仍得到 Stebbins (1971) 和 Jones (1978) 等人的支持。Lima-de-Faria 认为着丝粒区螺旋化程度降低，每条染色单体在此区内有2—5个相间隙的染色粒 (图1-4)，纺锤丝与着丝粒的接触点在两个染色粒之间。着丝粒区由几对染色粒组成，可以解释为何着丝粒断裂时会产生两条有功能的染色