

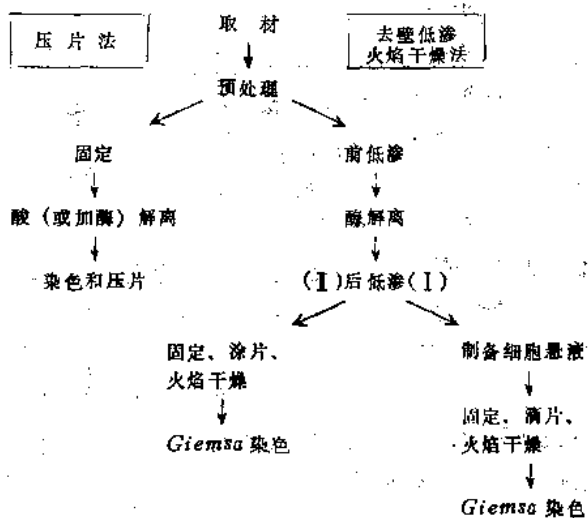
目 录

第一章 植物染色体的常规制片技术	(1)
第一节 取材	(2)
第二节 预处理	(15)
第三节 压片法	(31)
第四节 去壁低渗火焰干燥法	(48)
第五节 减数分裂的制片	(53)
第六节 减数分裂过程中染色体的鉴别性观察	(58)
第二章 植物染色体的分带技术	(68)
第一节 历史和现状	(68)
第二节 荧光分带	(76)
第三节 C—带	(78)
第四节 N—带	(100)
第五节 G—带	(102)
第六节 同一细胞的常规和分带方法	(105)
第七节 不同染色剂的显带试验	(108)
第八节 姊妹染色单体的分染技术	(111)
第九节 显带机制	(113)
第三章 植物染色体的银染技术、原理及应用	(122)
第一节 银染技术流程	(123)
第二节 核仁和 NOR 的银染色原理	(130)
第三节 在细胞学和细胞遗传学研究中的应用	(132)
第四章 核型和核型分析	(142)
第一节 核型	(142)
第二节 核型分析	(149)
第三节 染色体图象的计算机自动分析	(174)
第四节 自然核型的分析	(181)
第五章 显微摄影技术	(193)

第一节	被摄显微制片的准备	(193)
第二节	感光片的选用	(196)
第三节	物镜和目镜的选用	(202)
第四节	显微摄影的操作	(207)
第五节	黑白底片的冲洗	(216)
第六节	印相与放大	(224)
第七节	底片和照片的后加工	(231)
附录 I	植物细胞遗传学观察材料简介	(237)
附录 II	我国重要经济植物染色体数目	(244)
附录 III	植物染色体分带名录及文献	(260)

第一章 植物染色体的常规制片技术

染色体的常规制片技术，是指显示染色体的一般形态和结构的技手，而非显示染色体的特定结构的技术。目前国内外常用的技术可分为两种，即压片技术和去壁低渗火焰干燥技术，两者的主要操作程序如下：



以上程序表明，两种技术的取材和预处理的要求和操作是一致的，即材料的基础条件是相同的。所不同者只是使染色体分散所采用的方法。压片法是以人工外加的机械压力而使染色体分散。而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。两种技术各有优缺点，前者操作快速简便，节省材料；后者操作稍繁且需酶制剂，但染色体易于展开而不易导致染色体变形，尤其对一些

含较多成熟细胞的组织，如芽、愈伤组织等，其制片效果则明显优于压片法。

需要特别强调的是，两种技术成功的基础和关键是一致的，即首先应获得大量染色体缩短适宜的分裂细胞，在此基础上，熟悉掌握任一种技术，都不难作出优良的制片。否则，两种技术都是无能为力的。因此，在学习染色体制片技术时，应着重注意它们的共同点，而不宜过分强调两种操作技术的不同和优劣。

第一节 取 材

一般来说，凡是能进行细胞分裂的植物组织或单个细胞，例如，植物的顶端分生组织（根尖和茎尖），幼小的花，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，以及小孢子发育成雄配子过程中的两次细胞分裂等，都可以作为观察染色体的适宜材料（图1—1）。

如图1—1所表示的是在一个被子植物的生活史中，存在着两个不同世代的交替过程，即孢子体世代和配子体世代的交替。从双受精形成合子之后的胚的发育，种子萌发后植株的生长和花器官的形成，均以有丝分裂进行细胞的增殖。所有细胞中都含有双亲的各一套染色体，称为二倍体（ $2n$ ），即孢子体世代。大、小孢子母细胞经减数分裂之后，所形成的大、小孢子以及随后产生的雌、雄配子，染色体数目减半，谓之单倍体（ n ），即配子体世代。所以，这种世代交替的细胞学含义便是核相交替。植物的生活史中，通过 $2n-n-2n$ 这一交替机制，使染色体数目或遗传物质得以保持相对的稳定，以利于物种的连续传代。

在植物的生长发育过程中，各器官的分生组织或细胞的分裂活动，既有其自身发育的阶段性的，又受外界环境条件的影响。只有充分掌握这些组织的一般结构和生长发育的一般规律，了解每一具体植物的生长发育特性，创造适宜的环境条件，才便于取得

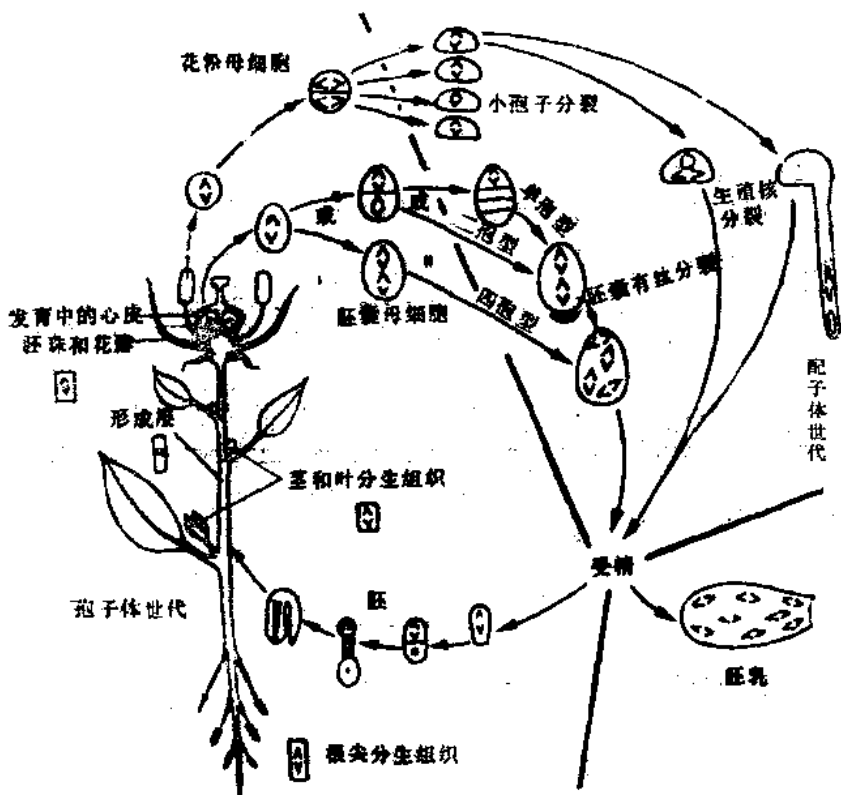


图1-1 被子植物生命周期中的细胞分裂

合适的材料。而准确的取材，是制作优良的染色体标本的基础。

本节内容包括这些分生组织或细胞的结构特点以及取材时的注意事项。

一、根尖

根尖的结构，以洋葱根尖为例，其纵切面包括四部分。根尖的最前端部分为根冠，系由不同分化阶段的薄壁细胞组成，而且常含淀粉粒，细胞已停止分裂。根冠有大有小，因植物而异，大者常成为染色体压片的障碍，可将其切除。根冠之上为分生区，

此部分约 1—2 mm 长。多为等直径的细胞，细胞质浓厚、细胞核较大并约占整个细胞体积的 3/4。分生区细胞均可进行不断的分裂活动，但是，不同部位的细胞分裂的频率是有明显差别的（图 1—2）。此外，细胞分裂也是不同步的。分生区以上为伸长区，细胞基本上停止分裂，主要是细胞体积增加。根毛区的细胞已基本上成熟。在制片操作时，伸长区和根毛区均应切除弃之。

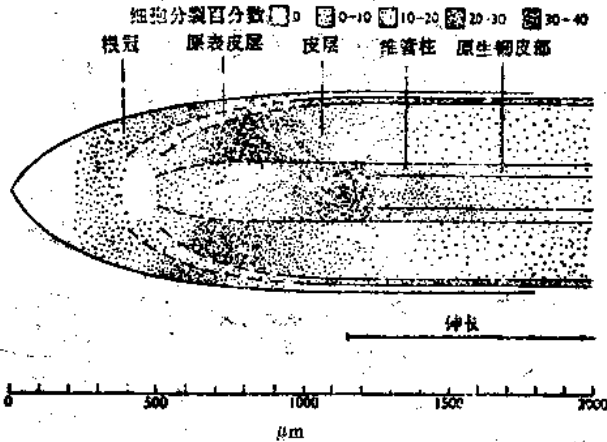


图 1—2 洋葱根尖纵切，示各部分细胞分裂的频率差异

在植物体细胞染色体的研究中，根尖分生组织为最主要的材料，因为取材方便，分生区易于识别，如以种子萌发取根，则不受季节的影响，这是其他材料所不及的。根尖材料可以从多种途径而获得，要根据具体情况从优选择，这些途径主要有：

(一) 以种子萌发取根

这是最常用的主要方法。为获得良好的种子根，除种子的饱满度和生活力等种子的品质外，种子的萌发条件的选择，以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，即所谓的“硬染色体”。而根尖生长势差的材料，不仅分裂频率低，而且染色体形态也多是扭曲的，即所谓的“软染色体”。这在人和哺乳动物的

染色体制片中也常见。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。这些方法包括：

1. 滤纸培养法：适用于某些蔬菜作物的小形种子和禾本科植物种子的萌发，但该方法换水不便，霉菌易于污染。

2. 纱布培养法：即将种子用潮湿的新纱布包裹，置于加盖的玻璃容器中萌发，每天用温水洗涤1—2次。此法很适合多数小型种子的萌发，效果比前者为优。

3. 蛭石、锯末或砂土培养法：基质消毒后，非常适于容易腐烂的豆类种子萌发。

4. 水培法：即取包装用的硬质泡沫塑料薄片，在其上打出大小适宜的小孔，然后将种子的胚一端朝下植入小孔中，与水面可接触，制成培养床，使其飘浮在任一可盛水的大容器的水面上。此法不需换水，取根甚为方便，适合于各种大形种子的萌发。也适用于某些小鳞茎（例如大蒜）的萌发取根。

5. 试管培养法：某些稀少或珍贵的种子，或种皮含抑制萌发物质的休眠种子，可经消毒，剥去种皮接种在MS琼脂培养基上培养。此法培养的根尖生长良好，细胞分裂频率也较高，是很有效的方法。

（二）鳞茎水培取根

此法适用于洋葱、蒜、中国水仙、风信子等。水培中经常更换新鲜的同温水，是获得良好材料的关键。

（三）扦插取根

此法适用于扦插繁殖为主的植物，如杨、柳、桑、葡萄、菊花等。

（四）从植株上直接取根

此法适用于大部分禾本科植物，例如，麦类作物生长季长出大量不定根，比种子萌发的根更健壮，是很好的材料。

综上所述，无论以什么方式取根，注意使根的生长处于最佳条件，同时在根的生长势最强时取材是成功的基础，不可忽视。

二、茎尖

一个营养生长的茎尖的宏观结构，一般包括生长锥和叶原基两部分。广义上讲的芽则尚包括幼叶和腋芽原基。生长锥即茎的顶端分生组织区。不同植物或同一植物的不同发育阶段，其生长锥的大小和形状都有较大变化。例如，在形成叶原基时和间隔期，两者生长锥的形状便不同，它们可以是扁平的或是稍下凹的、圆丘状的、圆锥状的及非常伸长的（禾本科）。其宽度从 $40\mu\text{m}$ （丁香）到约 $300\mu\text{m}$ （苏铁）不等。

茎尖分生组织中，不同部位的细胞分裂的频率和细胞周期的长短是不同的，如表1—1所示。

表1—1 某些植物茎尖分生组织的细胞周期(h)

植物名称	中心区	叶原基区
豌豆	70	28
金光菊	>40	30
曼陀罗	76	36
水韭	>53	36
菊花	140	70
茄	117	74
真蕨	360	96
锦紫苏	237	157

注：引自 Yeoman, 1973年。

表1—1说明，生长锥侧面的叶原基区比中心区的细胞周期约缩短一倍时间，用秋水仙素处理以后统计其细胞分裂指数，也表明中心区比叶原基区少一倍左右，二者是基本相符的。因此，取材和制片观察时应注意这一特点。

茎尖的取材，主要适用于一些难以获得种子或种子不易发芽的木本植物。例如，许多果树、竹类、木本花卉等，常常取茎尖为材料。此外，许多禾本科植物的根尖往往比较坚硬而难制片。其

茎尖细胞则更柔嫩和易于制片，尤其是用压片法，是比之根尖更为优良的材料。

茎尖取材困难和操作繁复是其主要缺点，因为，其有生长季节的严格限制，休眠芽是不适于取材作细胞学观察的。其次，是取材时一般需要在放大镜下剥去幼叶，切取生长锥和叶原基部分。即便如此，也常常难免带有一些成熟细胞或是木质分子、结晶等。所以，许多茎尖材料不适于用压片法，而宜用去壁低渗法制片。

三、幼叶

从叶原基发育至成熟的叶片，其生长发育的早期，主要以细胞的分裂活动而增加其体积，所以，在幼叶期也可供作为染色体研究的材料。幼叶的分生组织，按其分布位置而定，可以分为顶端分生组织，近轴分生组织，边缘分生组织，板状分生组织和居间分生组织等。上述分生组织细胞的同时或顺序的分裂活动，促使幼叶生长发育形成各种形状的叶片。但是，不同植物或同一植物的不同生长时节或在不同的环境条件下，各种分生组织的相对活动和持续活动是不同的。总的说来，一般顶端分生组织的细胞分裂活动停止较早，居间分生组织较晚，即叶片的成熟过程是由顶向基的。边缘分生组织的活动依叶片的厚度而异，厚叶者其活动时间较长。板状分生组织则增加叶片的宽度。但不同的植物有千差万别，例如，蕨的幼叶的顶端分生组织的活动时间较长，禾本科植物有发达的居间分生组织，水仙则无顶端和边缘生长，而只有居间生长。

Sharma (1984年)⁽²⁾曾对幼叶的分生组织和根尖分生组织细胞的分裂指数进行了比较观察。据此，确认幼叶作为染色体的研究材料，是有应用价值的。

幼叶的取材，大小因植物而异，总的原则是越小越好。以麦类植物为例，以0.5—1 cm长的幼叶为宜，取其叶片基部制片

表1—2 幼叶和根尖细胞有丝分裂指数的比较

植物名称	根 尖		幼 叶	
	细胞数	中期细胞 (%)	细胞数	中期细胞 (%)
“中国春”小麦	81	7.4	116	11.3
球茎大麦	91	15.4	116	10.4
山羊草 × “中国春” 小麦 F ₁	196	9.4	160	10.6

注：引自 Sharma, 1934年。

最好。

四、幼小子叶

在双子叶植物中，子叶极为发达，在胚的发育早期，亦有非常旺盛的细胞分裂活动，是观察染色体的良好材料。尤其是一些豆科植物，取材也极方便，在开花结实期间，可以获得大量材料。

张长顺⁽³⁾曾对蚕豆和豌豆的子叶和根尖细胞的有丝分裂指数进行了比较研究（表1—3），表明取材合适的幼小子叶，其细胞分裂指数常高于根尖材料，而其变异系数则又小于根尖材料。

蚕豆、豌豆子叶和根尖分生组织

表1—3 细胞的有丝分裂指数比较

材 料	子叶或 根尖数	观 察 细胞数	分 裂 细胞数	有丝分 裂指数 (%)	t 测定
蚕豆子叶	33	6 931	1 105	160	P<0.01
蚕豆根尖	31	6 637	504	76	
豌豆子叶	30	4 562	707	155	P<0.01
豌豆根尖	33	5 500	425	77	

注：引自张长顺，1935年。

子叶的取材，以胚发育早期的幼小子叶为宜，越小越好。作为取材标准，以子叶细胞尚未积累淀粉之前最为适宜，大小则因植物的种子大小不同而异。例如，蚕豆的幼小子叶长 1.5—3

mm；小巢菜 1—1.5mm；菜豆 1.5—2.5mm 者为宜。如果以去壁低渗法制片，其取材的长度尚可增大，不过其细胞分裂指数会随子叶的增大而急骤下降。总的来看，从取材之方便和制片之容易两个方面而言，幼小子叶均优于幼叶，是很有应用价值的材料。

五、居间分生组织

禾本科植物茎的生长，除有顶端分生组织的细胞分裂和伸长之外，还有居间分生组织的活动。当茎生长时，茎尖分生组织的细胞分裂均匀地分布于整个节间，由于细胞反复地横向分裂而使节间伸长。继续生长，同一节间上部的细胞最先分化和成熟，细胞的分裂活动便逐渐下移而局限于节间的基部，并在一段时间内保持着细胞的不断分裂，这就是居间分生组织。类似的居间分生组织也存在于一些植物的花萼和花梗中。如花生的雌蕊柄，其分生组织相当发达。可长达 5 mm。此外，一些植物的卷须的生长，也依赖于居间分生组织频繁的分裂活动。

当用居间分生组织为材料观察染色体时，以禾本科植物的幼叶叶鞘应用最广泛。取材时一般选用幼苗（2—3叶时期）或幼小分蘖，剥除外部的叶片，取其心叶，切取叶鞘基部约 1—2 mm 部分，进行预处理。

六、茎的形成层

形成层为茎的侧生分生组织，双子叶木本植物形成层的季节性分裂活动，导致了茎的加粗。由于形成层位于木质部和韧皮部之间，取材极不方便，故很少用于观察染色体。但是，在特殊需要时，也可以采用以下方法取材，即在生长季节，用凿子在树皮上打一个长、宽约为 1 cm 的小洞，直至木质部，除去树皮，在其外边包扎上一层塑料薄膜，以防干燥。几天之后，可见到由木栓形成层产生的愈伤组织，然后，取该愈伤组织进行预处理。

七、愈伤组织

这是指在人工培养条件下产生的愈伤组织。植物组织的培养在理论研究和育种实践中应用时，常常需要检查所培养的愈伤组织的染色体数目或结构的变异。

在一块愈伤组织中，细胞分裂比较集中的部位通常难以确定，同时细胞的分裂活动受培养条件的影响较大，所以，准确取材比较困难。在此只能原则上谈谈取材时应注意的两点：其一，以转移到新鲜培养基上3—7 d后取材较为合适，此时容易获得较多的分裂细胞；其二，应在解剖镜下仔细辨认正在生长和已老化了的细胞群。通常，老化的细胞群比较疏松而呈透明状，这是因为细胞体积较大而且高度液泡化之故，而分生细胞群的细胞较小，含较大的细胞核和浓厚的细胞质，故外观上显得致密而折光性较强，所以，应取此类细胞群进行预处理。

八、花蕾

从花芽开始形成至进入减数分裂之前的幼小花蕾，包括花瓣、雄蕊和雌蕊都正在发育，进行着旺盛的细胞分裂活动。这是除根尖之外，最为理想的材料，尤其是对一些难以获得根尖材料的木本植物而言，则更是如此。它的最大优点是在植物的孕蕾时节，可以从植株上取得大量的材料，其次是幼小的花药和子房，往往比某些根尖更便于制片操作。例如，一些禾本科作物，其根尖压片是很困难的，通常，需要预先用酶加以处理，而取用雌、雄蕊开始分化时的幼穗，则很易于压片。从已做过取材观察的芍药、牡丹、月季、杜仲以及多种果树来看，都是很理想的。例如，芍药和牡丹，若取材适宜，其细胞分裂指数是普遍高于根尖的。花蕾的取材通常需以镜检作出选择，其方法是取出幼小花药或子房，直接以1 N HCl处理约5—10 min，水洗后用卡宝品红染色和压片，以镜检细胞分裂的状况，来确定是否适于取材处

理。

九、花粉

花粉母细胞减数分裂之后，所形成的小孢子至发育成为成熟的花粉（雄配子体），要经过一次或二次有丝分裂过程，形成具二细胞或三细胞花粉。在作过观察的260科植物中（约2000种），含二细胞花粉者179科，例如，百合科、石蒜科、鸭跖草科、茄科等。此外，某些裸子植物也属于此类型。含三细胞花粉者54科，例如，禾本科、菊科等。另有32科则兼具两种类型的花粉，其中具二细胞花粉的种约占70%。尚有极少数植物，同一种中兼具二细胞和三细胞花粉，例如，堇菜属（*Viola*）。

利用小孢子发育中所进行的有丝分裂过程来观察染色体，有其独特的优点：染色体数目是单倍数（ n ），为计数或作核型分析提供极大方便；可同时获得大量材料或分裂细胞；一般不需要进行预处理和细胞的解离等操作。因此，对难以获得种子或种子萌发困难的植物来说，是可供选择的材料来源。

与减数分裂的取材类似，多以植物的某些器官的形态发育特征为参考依据，例如：

小麦：一般来说，当具芒品种的穗芒伸出旗叶叶鞘1—4 cm、无芒品种的旗叶叶鞘稍微张开而露一点穗头时取材为最合适的时间，此时的花药呈黄绿色至淡黄色。

玉米：一般当雄花序抽出约3 cm时取材，将获得小孢子第一或第二次分裂的大量细胞。由于玉米雄花序上的小花很多，且发育不同步，是最易于取材的植物。

水稻：在放大镜下观察柱头为球状并有分枝突起至柱头为扫帚状有羽状分枝出现之间，均为小孢子发育至成熟花粉时期。

棉花：在减数分裂完成之后约12—13 d，开始小孢子第一次分裂，此时的花蕾长度（陆地棉）约为10—13 mm。

芍药：多数芍药品种为重瓣花，常见到花药花瓣化过程，因

此，花药大小以及发育上都有较大差异，很便于取材。一般花蕾直径达 1.5—2cm 时取材较为适宜。此外，一些品种还存在二型花粉，其中的“E”花粉尚有向孢子体方向发育的现象，形成多核或多细胞的异常花粉，此类花粉的细胞分裂甚至可以持续至花开放。芍药的染色体数目较少 ($2n=10$)，体积较大，是很好的观察小孢子有丝分裂染色体的材料。

凤仙花：为二细胞花粉，但是其生殖细胞或生殖核提前在花粉粒中分裂，并休止在中期，7 个染色体 ($n=7$) 呈线状排列，进入萌发的花粉管中方继续分裂。因此，当凤仙花开花时取其花粉，即可观察到处于分裂中期的染色体。

银杏：通常在减数分裂完成之后 6—8d 进入小孢子分裂，(图 1—3)，在同一花药中其细胞分裂也是不同步的，可以看到有丝分裂的各不同分裂时期，此时期的花药呈黄绿色。

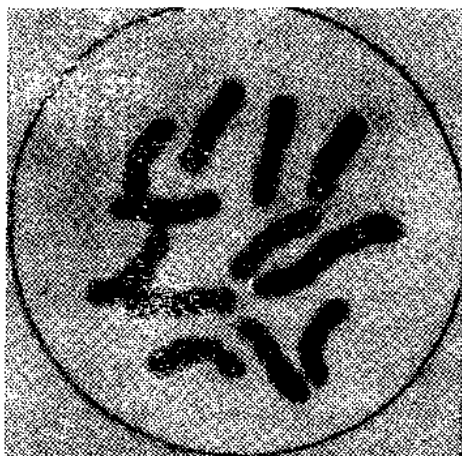


图1—3 银杏单核小孢子分裂中期染色体， $n=12$

十、生殖核在花粉管中的分裂

含二细胞的花粉，

生殖核的分裂是在萌发的花粉管中进行的，以此为材料进行染色体观察(图 1—4)，目前已有一些报道。它的优点是易于获得大量材料，花粉用冷冻干燥和真空保存，能贮存相当长时间，可以人工控制和直接观察细胞分裂过程。缺点是不同植物花粉萌发的条件不一致，实验操作也相对繁复一些。不过，在许多木本植物中，还是有一定应用价值的。

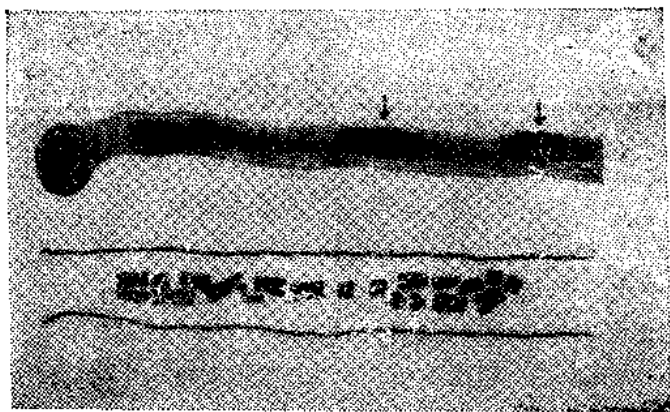


图1—4 一种黄精属 (*Polygonatum*) 植物的花粉管中生殖核分裂中期染色体(下)和花粉管中形成2个精子(上)

观察花粉管中生殖核的分裂，包括花粉的采集、保存、培养和观察等步骤。

(一) 花粉的采集

选取当天正开放或散粉的花，用干净的毛笔将花粉轻轻刷入培养皿中，要注意防止花粉在阳光下曝晒或沾水。将收集的花粉及时带回实验室，让其摊开晾干约 0.5—1h 后待用。也可以将正开花的单花或花序切取带回实验室，取下成熟花药让其自行开裂散出花粉。

(二) 花粉的贮藏

如花粉需短期贮藏，可将花粉装入玻璃管中，密封，然后，放入玻璃干燥器中，置冰箱 (0℃—4℃) 中保存备用。

(三) 花粉培养

1. 培养基：花粉管萌发的人工培养，需用培养基，其成分包括：

基质 许多植物可在单一的蔗糖水溶液中萌发，其浓度在 8%—30% 之间。例如，紫露草为 8%；郁金香 14%；大花延龄草

15%；百合 12.5%；梨 20%—30% 等。不过为了更便于制片操作，常用 1%—2% 的琼脂或明胶作为基质，如用琼脂或明胶为基质，仍需加入适量蔗糖或乳糖，其目的是为了调整渗透压及花粉管的生长提供一定量的碳源。

硼 花粉萌发时往往需要较多的硼作为刺激物，培养基中加入约 100—200ppm 的硼酸，可促进花粉的萌发。

秋水仙素或萘 为了使细胞分裂停止在中期，可在培养基中加入 0.01%—0.05% 的秋水仙素，或在培养皿中加几粒萘结晶，利用萘的蒸汽对纺锤丝微管起抑制作用。

2. 培养方法：可用悬滴培养法，或将琼脂或明胶溶液均匀地在载片上涂一薄层，撒上花粉，在潮湿的培养皿中培养。

3. 温度和湿度：适宜的温度为 20℃—25℃。湿度则要求近于饱和的条件。

花粉萌发后，定时取样或直接在低倍显微镜下检查，多数花粉在萌发后约 6—10 h，生殖核才开始分裂，其可直接用卡宝品红进行染色和压片。

十一、胚乳

最适于用胚乳作为观察染色体的植物是裸子植物，如松、柏、银杏等。因其胚乳及后期雌配子体，含单倍的染色体数目，细胞分裂的时间持续较长，传粉受精之后即可取材。被子植物中，大多数植物都是核型胚乳，即在胚乳发育的早期，核进行有丝分裂，但不形成细胞壁，有一段游离核时期，然后，再形成细胞壁。一般传粉后 3 d 即可开始取材。通过 Lin Bor-yaw (1977 年)〔4〕研究玉米胚乳的染色体的经验来看，从植株上取下胚珠，胚乳极易变质，因此，取材时应立即浸入含蔗糖的预处理液中处理，否则，将很难观察到细胞分裂。

虽然多数植物的胚乳为三倍体，即由一个雄核和两个极核融合产生。但有些植物参予融合的极核则不是两个，因此，其胚