

植物生殖生物学 研究法

ZHIWU SHENGZHI SHENGWUXUE YANJIUFA

刘向东 李亚娟 主编



华南理工大学出版社
SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PRESS

013024296

Q945

13

植物生殖生物学 研究法

ZHIWU SHENGZHI SHENGWUXUE YANJIUFA

主 编 刘向东 李亚娟

参编人员 (按姓氏拼音顺序排序)

陈志雄 郭海滨 郭静玉 王 兰

杨跃生 张华华 张秀香



北航

C1630410



华南理工大学出版社
SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PRESS

· 广州 ·

Q 945

13

08515610

图书在版编目 (CIP) 数据

植物生殖生物学研究法 / 刘向东, 李亚娟主编. —广州: 华南理工大学出版社, 2012. 8

ISBN 978 - 7 - 5623 - 3747 - 8

I. ①植… II. ①刘…②李… III. ①植物 - 繁殖生理 IV. ①Q945.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 198197 号

植物生殖生物学研究法

刘向东 李亚娟 主编

出版发行: 华南理工大学出版社

(广州五山华南理工大学 17 号楼, 邮编 510640)

<http://www.scutpress.com.cn> E-mail: scutel3@scut.edu.cn

营销部电话: 020 - 87113487 87111048 (传真)

责任编辑: 张 颖

印刷者: 佛山市浩文彩色印刷有限公司

开 本: 787mm × 1092mm 1/16 印张: 9.75 彩插: 8 字数: 262 千

版 次: 2012 年 8 月第 1 版 2012 年 8 月第 1 次印刷

印 数: 1 ~ 4000 册

定 价: 28.00 元

版权所有 盗版必究 印装差错 负责调换

序 言

有性生殖过程是植物个体发育最为复杂与曲折的生理过程,包含孢子体—配子体—孢子体的世代交替,是联结植物亲予代之间的桥梁。植物生殖生物学主要研究植物生殖过程所涉及的胚胎学、细胞学、遗传学、分子生物学和遗传操作等内容,包括花粉发育、胚囊发育、双受精、胚胎发生与发育、胚乳发育、种子发育和特殊生殖的生物学及生殖工程等。这些生物学过程涉及一系列的组织和细胞形态、结构和物质的变化,每一变化均需通过一定的技术操作才能观察到,所以,建立植物生殖生物学的研究方法是十分必要的。目前未见到有关植物生殖生物学研究方法或实验指导书出版,该领域的实验研究缺乏系统的指导工具书。鉴于此,编者在自编的《植物生殖生物学实验指导讲义》(李亚娟,刘向东编,2007)的基础上,进一步将本室建立的有关实验方法以及其他相关研究者的实验方法加以系统整理,写成《植物生殖生物学研究法》一书,用作相关专业研究生实验教材,也为从事植物生殖生物学研究的工作者提供参考。

本书由刘向东筹划,共分为九章。第一章“显微观察与图像处理技术”由刘向东、陈志雄编写;第二章“整体透明与 WE-CLSM 技术”由郭海滨、张华华(广东医学院)、刘向东编写;第三章“活体压片和染色体制片技术”由李亚娟编写;第四章“组织切片技术”由郭静玉(河南大学)、李亚娟编写;第五章“电子显微镜制样技术”由李亚娟、郭静玉编写;第六章“荧光显微术”由张华华、刘向东编写;第七章“植物生殖器官组织培养技术”由杨跃生编写;第八章“植物转化技术”由张秀香、陈志雄、刘向东编写;第九章“生物信息分析技术”由王兰编写。全书由刘向东和李亚娟统稿,郭海滨和刘向东绘图,俞淑红协助本书部分工作。本书的出版得到国家自然科学基金、国家特色专业(农学专业)和广东省重点专业(农学专业)等项目经费的资助。在此一并表示感谢!

由于编者水平有限,书中难免存在一些缺点和不足,请广大读者批评指正。

刘向东 李亚娟

2012年5月

目 录

第一章 显微观察与图像处理技术	1
第一节 正确使用万能生物显微镜	1
第二节 体视显微镜使用技巧	6
第三节 显微摄影技术、图像处理及图版制作技巧	8
第二章 整体透明与 WE-CLSM 技术	14
第一节 激光扫描共聚焦显微术	14
第二节 WE-CLSM 技术	20
第三节 氢氧化钠透明技术	22
第三章 活体压片和染色体制片技术	27
第一节 活体压片与 DIC 技术	27
第二节 染色体涂片和压片技术	30
第四章 组织切片技术	37
第一节 石蜡切片技术	37
第二节 塑料半薄切片技术	45
第五章 电子显微镜制样技术	53
第一节 透射电镜超薄切片技术	53
第二节 扫描电镜制样技术	65
第六章 荧光显微术	72
第一节 荧光显微术的基本工具——荧光显微镜	72
第二节 荧光显微术的基本染色技术	76
第三节 间接免疫荧光技术	81
第四节 笼锁-解笼锁测定术	88
第七章 植物生殖器官组织培养技术	94
第一节 花药培养技术	94
第二节 子房培养技术	100
第三节 胚胎培养技术	103
第四节 其他组织培养技术	107
第八章 植物转化技术	113
第一节 农杆菌介导的植物转化技术	113
第二节 显微注射转化技术	121

第三节 植物大片段 DNA 转化技术	124
第九章 生物信息分析技术	128
第一节 功能性标记(引物)设计技术	128
第二节 序列比对与基因功能区分析	132
第三节 分子进化树构建技术	138
附录 1 常用固定液的性质及配方	143
附录 2 间接免疫荧光技术所用主要溶液配方及洗滤器的制作步骤	148
附录 3 植物大片段 DNA 转化技术主要试剂	149
附录 4 彩图	151

第一章 显微观察与图像处理技术

显微观察及图像处理是植物生殖生物学研究中最常用的技术，如何正确使用生物显微镜获取图像并进行有效的处理显得尤为重要。本章结合作者多年的经验，介绍如何使用万能生物显微镜、显微图像的处理方法以及制作图版的技术。

第一节 正确使用万能生物显微镜

一、生物显微镜的种类

生物显微镜的种类很多。根据光源的特性和结构特点，一般可以将生物显微镜分为两大类：一类是光学生物显微镜（以下简称光学显微镜）；另一类是电子生物显微镜（以下简称电子显微镜）。电子显微镜主要包括透射电子显微镜和扫描电子显微镜两种。光学显微镜根据使用功能、成像效果、光源种类和光路可以分为多种类型，具体如下：

I. 根据使用功能，可以将光学显微镜分为普通光学显微镜和万能生物显微镜，前者通常是指单性能普通光学显微镜，后者指同时具有普通透射、暗场、相差、微分干涉（differential interference contrast, DIC）和荧光等多功能的复合型显微镜。

II. 根据成像的效果，光学显微镜可分为普通透射显微镜、暗视野显微镜、位相显微镜（又称相差显微镜或相衬显微镜）、荧光显微镜和微分干涉差显微镜（又称干扰或干涉显微镜）等。一般来说，万能显微镜通常集成了这些功能。本节重点介绍此类万能生物显微镜的基本原理和正确使用方法。

III. 根据所采用的光源种类，可以将光学显微镜分为普通光学显微镜、荧光显微镜和激光共聚焦显微镜。其中，普通光学显微镜的光源主要是卤素灯，波长为可见光；荧光显微镜的光源主要是汞灯，波长除了可见光外，还有紫外光；激光共聚焦显微镜的光源主要是激光，波长专一，具体波长取决于激光管的种类，包括发射可见光的激光管、发射紫外光或红外光的激光管（具体内容见有关激光共聚焦显微镜原理章节）。

IV. 根据光路的种类，可以将光学显微镜分为正立透射显微镜、倒置显微镜和体视显微镜三大类。其中正立透射显微镜的物镜在载物台上方，光线从载物台下方入射到样本，再到物镜；倒置透射显微镜的物镜在载物台下方，光线从载物台上方入射到样本，再到物镜；体视显微镜的光线有透射和外源光源入射两种，观察看到的通常是样本表面的立体图像。目前的高级正立透射显微镜和倒置显微镜一般都同时具备普通透射、暗场、相差、荧光和微分干涉差等功能。

二、光学显微镜的结构与原理

不同的光学显微镜（下面简称为显微镜）结构有所不同，但基本结构都包括两大部分：一是光学部分，包括目镜、物镜、聚光器、视场光阑、孔径光阑和光源等；二是机械部分，包括镜座、镜筒、物镜转换器、载物台、焦距调节部件和显微摄影部件等。

显微镜的基本原理包括以下两点：

一是凸透镜的放大成像原理。简单地讲就是将人眼不能分辨的微小物体放大到人眼能分辨的大小。通常是由两组会聚凸透镜组成，被观察的物体经物镜（凸透镜）成放大倒立的实像，该实像位于目镜的物方焦距的内侧，经目镜后成放大的虚像于明视距离处（离眼睛距离为 25 cm 处）。具体光路如下：

光线→反光镜→遮光器（视场光阑）→聚光器→通光孔→镜检样品（透明）→物镜（第一次放大成倒立实像）→镜筒→目镜（再次放大成虚像）→眼。

二是光线控制原理。通过视场光阑和孔径光阑等部件控制，使光线达到科勒照明（Kohler illumination）的要求。科勒照明是由德国蔡司的科勒先生（August Kohler）于 1893 年首先研发的一种理想的照明方法，该方法能使样品获得均匀而充分明亮的照明，又不会产生耀眼的眩光等有害光线。科勒照明是指光线达到使整个视场照明均匀、亮度足够、光线平行和有害光线少（即排除光晕）等要求。在使用显微镜时，一般需要调节才能使之真正达到科勒照明的要求。

下面以 Olympus BH-2 和 Leica DMRXA 两种万能生物显微镜为例，介绍其结构和基本原理。

1. Olympus BH-2 万能生物显微镜的结构和基本原理

Olympus BH-2 万能生物显微镜是 20 世纪 80 年代生产的标志性显微镜。由于该镜同时具备普通透射、相差、暗场、DIC 和荧光显微镜的功能，加上价格比较适中，所以当时很受欢迎，国内不少单位都购置了该种显微镜，目前仍有许多单位使用。

Olympus BH-2 显微镜的机械装置主要包括镜座、镜臂、载物台、物镜转换器、调焦装置和摄影镜筒等；光学系统主要包括物镜、目镜、反光镜、聚光器、孔径光阑环、滤色镜座和视场光阑环等（彩图 1-1A，全书彩图均放在附录 4），其中物镜有平场复消色差物镜（S Plan Apochromat）、平场消色差物镜（S Plan Achromat）和平场物镜（S Plan FL）三种类型，每一种类型均有 5×（倍，下同）、10×、20×、40× 和 100× 等。100× 高倍物镜采用浸油物镜，即在物镜的下表面和标本片的上表面之间填充折射率为 1.5 左右的液体（如杉木油），它能显著提高显微观察的分辨率。每个物镜镜筒壁上均标有不同的参数，具体如彩图 1-1D 所示。目镜有 10× 和 15× 两种。按照所能看到的视场大小，目镜可分为视场较小的普通目镜和大视场目镜（或称广角目镜）两类。目镜上装有视度调节机构，可以方便快捷地对左右眼分别进行视度调整，调节到 25 cm 的明视距离，使两只眼看到的图像均是最清晰的。

聚光镜按照配置需要可以分为摇摆聚光镜、相差聚光镜和微分干涉聚光镜等。由于这些聚光镜是分开的，需要时才装上，所以使用起来比较麻烦。目前万能生物显微镜基

本上是组合式，全部功能的聚光镜都安装在同一个聚光镜盘上不同的孔中，只要转动聚光镜盘就可以转换聚光镜，所以很方便。孔径光阑环上具有与物镜相对应的孔径系数，可以根据所用物镜进行对应调整。

Olympus BH-2 万能生物显微镜的基本原理同上，也是利用凸透镜的放大成像原理和光线控制原理，在此不再重述。

2. Leica DMRXA 万能生物显微镜的结构和基本原理

Leica DMRXA 万能生物显微镜具有多个由电脑控制并能自动转换或具有升降功能的部件，包括物镜、滤光片和载物台等，所以也称为万能自动生物显微镜。该显微镜通常用于配合 QFISH（染色体荧光原位杂交）的研究。

Leica DMRXA 万能显微镜的主要结构与 Olympus BH-2 显微镜相似，包括机械装置和光学系统。主要的不同有 6 点：①Leica DMRXA 万能显微镜装有马达，用于驱动物镜和滤光片的转换，以及载物台的升降。②Leica DMRXA 万能显微镜的聚光镜是组合式的，不同功能的聚光镜，包括普通视场、相差聚光镜、暗场和微分子干涉聚光镜都被安装在同一个聚光镜盘上，只要转动聚光镜盘就可以实现不同聚光镜的转换。③Leica DMRXA 万能显微镜的粗调和微调都是电动的，其中微调具有 4 挡不同的调幅，每挡调节幅度不一样，方便选择，其中低幅度调节特别适合于高倍镜的调焦，不易出现过度调节。④Leica DMRXA 万能显微镜的重要滤光片是组合式的，即不同的滤光片安装在同一旋转盘上，只要按动旋钮就可以调节不同的滤光片。一般设有 A、I3 和 N2.1 三个重要的滤光片，透射通道可以不用滤光片。此外，还有 4 片可选滤光片，分别是黑白胶卷、日光型彩色胶卷和两个减光滤光片（NC16 和 NC4）。⑤孔径光阑和视场光阑的调节位置不同，两者均位于基座左侧（彩图 1-1B）。⑥Leica DMRXA 万能显微镜的物镜的倍数种类比较多，除 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $20\times$ 、 $40\times$ 和 $100\times$ 物镜外，还有 $63\times$ 等；除具有油浸高倍物镜外，还有中低倍的水浸物镜，不但使用方便，而且清晰度很高。

Leica DMRXA 万能生物显微镜的基本原理同上。由于该镜具有很好的相差、暗场、微分子干涉和荧光显微镜的功能，所以在此也对其中的相差和暗场的原理进行介绍（分别以相差显微镜和暗场显微镜为例进行介绍）。

相差显微镜也称为相衬显微镜（phasecontrast microscope）。我们知道，人眼只能区分光波的波长（颜色）和振幅（亮度）。当光线通过无色透明的生物标本时，如果波长和振幅变化不大，那么在明场就很难观察到标本。为了解决这个问题，科学家利用光的干涉现象，设计了相差显微镜。相差显微镜利用了被检物体的光程之差，将人眼不可分辨的相位差变为可分辨的振幅差，所以，即使是无色透明的物质也变得清晰可见。相差显微镜的核心部件是具有环状光阑的聚光器和具有相板的物镜（常标有 ph 记号），不同倍数的相差物镜需要不同倍数的相差聚光镜与之配套，如使用 $10\times$ 的相差物镜，则需要调节相同倍数的相差聚光镜。相差显微镜主要用于观察活体细胞和没有染色的组织切片，切片不宜太厚，一般以 $20\ \mu\text{m}$ 为宜。

暗场显微镜通常称为暗视野显微镜（dark field microscope），有时也叫超显微镜（ultramicroscope）。暗视野显微镜的基本原理是丁达尔效应。当一束光线透过黑暗的房间，从垂直于入射光的方向可以观察到空气里出现的一条光亮的灰尘“通路”，这种现

象即称为丁达尔效应。暗视野显微镜的成像原理是：由于暗视野聚光镜内部抛物面结构的遮挡，照射在待检物体表面的光线不能直接进入物镜和目镜，仅散射光能通过，因而视野是黑暗的，而样本的边缘是亮的，从而可以通过目镜观察样本（实际上是待检物体的衍射光图像）。需要指出的是，暗视野显微镜看到的是样本的外形轮廓，内部结构是难以清晰看到的。所以，暗场显微镜一般是用来分辨微粒子（小至 4 nm），其分辨率可比普通显微镜高出 50 倍。使用时盖玻片和载玻片都应干净无刮痕，否则散射光增多，使背景发亮。

三、正确使用光学显微镜

正确使用光学显微镜的关键有以下三点：①调节瞳距；②调节明视距离；③调节科勒照明。下面分别以 Olympus BH-2 万能显微镜和 Leica DMRXA 万能显微镜为例介绍其操作规程。

1. Olympus BH-2 万能生物显微镜操作规程

(1) 正确的摆放

把显微镜放在牢固的干净台面上，镜座应距桌沿 6 ~ 7 cm。

(2) 开机

开机前首先检查电压调节钮是否位于低电压处，如不是，则需要调到低压处，然后打开光源开关。根据个人的适应性，调节光强至合适亮度。

(3) 转动物镜和摆放载玻片

利用物镜转换器使低倍镜（通常是 10 ×）镜头正对载物台上的通光孔。调节载物台使镜头至距载物台 1 cm 左右。将所要观察的材料小心放在载物台上，用压片夹固定载玻片，移动载物台使玻片上的样品位于通光孔的正中央。

(4) 调节瞳距和预对焦

利用目镜下方的瞳距调节器，将两个目镜调到适当的距离，当双目观察到的视野是一个大圆时，说明两个目镜中心距离与观测者的瞳距是大小一致的。如果看到的是两个分开的小圆，则说明两个目镜的距离比观测者的瞳距大，需要减小距离；如果看到的是两个部分重叠的小圆，则说明两个目镜的距离比观测者的瞳距小，需要增大距离。调好瞳距后就可以进行预对焦。先转动粗调钮，使载物台上升、物镜接近玻片（需要注意的是，载物台上升幅度和速度不要太大或太快，否则，物镜可能碰到甚至压碎玻片）。然后，双眼对准目镜，来回缓慢转动粗调，当看到玻片中材料的模糊影像时，改用细调调节，直至看到玻片中样品的清楚影像为止。

(5) 调节明视距离

双眼对准目镜，利用遮眼罩（或板）将左眼遮住，只让右眼可以看到视野的样本，来回转动细调，直至右眼看到清晰的样本为止。然后遮住右眼，只让左眼可以看到视野中的样本，旋转左边目镜上的视度调节环，直至左眼看到清晰的样本为止。此时，两只眼看到的图像均是最清晰的，明视距离调节完成。需要注意的是，左眼的调节不能用细调调节，否则会改变已调好的右眼明视距离。

(6) 调节科勒照明

①根据所用物镜孔径系数的大小,将聚光器外环上的系数调到相应的数值,使孔径光阑处于合适的大小。②样本移开视野,使视野内看不到样本,只能看到光亮的玻片。③逆时针转动视场光阑,使视场光阑处于最小处。双眼对准目镜,观察视野内的视场光阑环影像,同时旋动视场光阑环上下调节钮,直至看到清晰的视场光阑环影像,此时,应该看到一个清晰的十边形光亮图形。利用载物台下方的视场光阑环中央调节杆,调节视场光阑环影像,使之处于中心位置。顺时针转动视场光阑,此时,视场光阑环在视野内不断放大。当视场光阑环影像即将和视野圆周相切时,停止转动视场光阑,观察视场光阑环影像的每个角是否与视野的圆周相切,如果是,说明视场光阑环已处于中央了(彩图1-1E),否则需要再调节视场光阑环中央调节杆,直至视场光阑环影像的每个角都与视野的圆周相切。④再顺时针稍微转动视场光阑,使视场光阑环影像充满视野。此时,就完成了科勒照明的调节。需要说明的是,由于不同倍数物镜孔径系数等的差异,所以当改用其他物镜观察时,需要按照以上的步骤重新调节科勒照明。另外,观察不同的玻片,由于玻片和盖玻片厚度等差异,利用同一倍数的物镜(该物镜在上次观察时已调好科勒照明)观察,也需要按照以上步骤重新调节科勒照明。还有一点是在科勒照明调节好后,可以进行明视距离的校正,即将样本转到视野内,重复明视距离调节的步骤即可。

(7) 高倍镜观察

在利用所选用的高倍物镜进行观察之前,一是将孔径光阑的大小调至与物镜相对应;二是进行预对焦,看到清晰的样本;三是进行与此物镜相应的科勒照明调节。调节好后就可以进行高倍镜的详细观察。如果需要换100×油镜进行观察,那么首先要下降载物台,在盖玻片上滴上镜油,小心地上升载物台,直至油接触到镜头,转动细调,直至看到清晰的物像。在利用高倍镜观察时,一般需要调高灯源的电压,以增加光亮。需要指出的是,千万不要通过旋动视场光阑环上下调节钮或聚光器孔径大小来调节光亮,否则,将改变已调好的科勒照明。

(8) 结束观察过程

观察完毕,先将载物台缓缓降下,取出玻片。然后,将高倍物镜镜头从通光孔处移开至低倍物镜,再将载物台上升至安全的高度。将灯源电压调至最低,关闭电源。电源关好后,最好把插头从插座拔出。最后,检查零件有无损伤(特别要注意检查物镜是否沾水沾油,如沾了水或油要用镜头纸擦净)。

2. Leica DMRXA 万能显微镜的操作规程

Leica DMRXA 万能显微镜使用规程总体上与 Olympus BH-2 万能生物显微镜相似,不同之处如下:

(1) 电源电压

由于 Leica DMRXA 万能显微镜是自动的,机内有集成电路等复杂部件,对电压的稳定性要求比较高,所以要求电源具有带延时的稳压器。

(2) 开机步骤

打开机身上的总开关,等待几十秒钟后(机内自动程序运行需要一段时间),打开

灯源开关,如发现灯源电压处于高位,应尽快调低。否则,可能影响灯泡的寿命。

(3) 转换物镜和滤光片

Leica DMRXA 万能显微镜是利用马达驱动物镜和滤光片转换的,所以需要利用指定的按钮进行转换。其中特别要注意的是,物镜从 $40\times$ 干镜转 $100\times$ 油镜,或者反过来转换,都需要先同时按镜基座边上的两个指定转换键,使载物台下降,然后,再按镜柄左侧的按键进行转换。滤光片的转换是利用镜柄中上部右侧的按键。这些过程也可以通过电脑直接进行控制,尤其在做 QFISH 时,必须通过电脑直接控制自动转换,否则难以进行。最好不要用手直接转动(不通过按钮)来转换物镜和滤光片,否则可能出现故障。

利用 Leica DMRXA 万能显微镜的暗视野功能进行观察的基本方法如下:①将聚光器转盘转到暗视野聚光器 D。②调高电压进行观察。

四、光学显微镜的维护

I. 良好的环境。光学显微镜必须摆放在干净、干燥和没有化学试剂的房间。

II. 操作者必须熟练掌握并严格执行使用规程。

III. 维修时,要找专门的维修工程师,不得自行随意拆卸零件进行维修。

IV. 使用完毕,要按照要求进行清洁。清洁时,凡是显微镜的光学部分,必须用专用的镜头纸和清洁剂(用无水乙醇和乙醚以 3:1 的体积比配制)擦拭;机械部分用干净的软布擦拭。

第二节 体视显微镜使用技巧

一、体视显微镜的结构和原理

体视显微镜(以下简称为体视镜)又称为实体显微镜或解剖显微镜,是一种具有正像立体感的目视仪器。由于其视场直径大、焦深大,可以观察被检测物体的全部层面;工作距离长、显直立像,便于实际操作。所以在植物生殖生物学形态观察与解剖等研究领域具有广泛的用途。

体视镜主要由机械系统和光学系统两部分组成。机械系统包括底座和镜身两大部分。光学系统包括物镜、目镜、棱镜组和光源等。

根据体视镜的光路设计特点,可以将体视显微镜分为两大类:一类是普通型的体视镜,其光路为“greenwell 光路”,即成一定角度的两个独立光路;另一类是扩展型的体视镜,其光路为“平行光路”,即通过物镜在末端改变光路方向。greenwell 光路简单,中间不能有扩展,价格比较便宜;平行光路可增加其他功能,如同轴光和荧光等,价格也较贵。Leica MZ16 体视显微镜和 Leica MZ16A 全自动体视显微镜就是采用平行光学系

统和整体复消色差校正光路的。

体视镜的光学结构基本原理是：先利用一个共用的初级物镜采集图像，物体成像后，通过两组中间物镜（亦称变焦镜）分成两个光束，并组成一定的角度，称之为体视角，一般为 $12^{\circ} \sim 15^{\circ}$ ，再经各自的目镜成像。由于利用了双通道光路，双目镜筒中的左右两光束不平行，而是具有一定的夹角，所以为左右两眼提供一个具有立体感的图像。实质上，体视镜相当于两个单镜筒显微镜并列放置，两个镜筒的光轴构成相当于人们用双目观察一个物体时所形成的视角，由此，形成三维空间的立体视觉图像。体视镜的倍率变化是由改变中间镜组之间的距离而获得。根据实际的使用要求，高级的体视显微镜可选配不同的附件，比如更大倍数的目镜或物镜，照明系统可以选配反射光和透射光，灯源可以选配环形灯、荧光灯和冷光源等。另外，可以接上数码 CCD 配合电脑进行数码摄影。

二、体视显微镜的使用规程

各种体视镜的使用方法大同小异。一般来讲，平行光路的体视镜的使用方法较 greenwell 光路复杂一些。下面结合 Leica MZ16 体视镜的特点介绍使用方法。

Leica MZ16 体视镜是比较先进的体视镜，与目前最先进的 MZ16A 型全电动体视显微镜比较，前者仅少了电动变倍和电子显示功能，其他的功能基本一样。Leica MZ16 体视镜具有较好的分辨率和复消色差能力，平场复消色差 $1 \times$ 物镜（可以选成 $2 \times$ 物镜）下分辨率达每毫米 420 ~ 840 线对。基本变倍倍率为 7.1 ~ 115 倍，最大放大倍率可达 920 倍。视野直径在 0.3 ~ 58.3 mm 之间，工作距离为 19 ~ 297 mm。配有冷光源的反射光、透射光和同轴光，以及荧光光源。采用马达驱动对焦并具有自动记忆定位功能。

Leica MZ16 体视镜的使用步骤如下：

(1) 打开电源

电源开关包括主机马达控制开关（位于主机中后部）、冷光源和同轴光电源控制开关。值得注意的是，打开冷光源和同轴光电源开关前，需要将电源控制器的电压旋钮旋到低位，即绿色标注的低电压处。

(2) 预对焦

将一张带字的纸片放在载物台上，调整冷光源的角度，使光线能均衡射到中部，利用纸片上的字，通过调焦控制器的旋钮旋动进行对焦，调整光强大小至合适程度，并进一步调整冷光源的角度。

(3) 对焦

将需要观察的材料放在载物台中部，边调焦边调整光源的角度，使左右侧的光线和亮度均匀；利用变倍旋钮进行放大，找到合适的放大倍数就可以进行下一步的观察了。

(4) 观察

边调焦边观察不同层面的图像。当找到需要特别观察的位置，可以进一步放大倍数进行观察。对于易干的材料，可以在其周围放一块湿的滤纸补湿，或者尽快录取图像，再利用图像仔细观察。

(5) 录取图像

具体操作见本章第三节。

三、体视显微镜观察水稻花发育

利用体视显微镜对水稻花器官突变体 *lsh(t)* 的四轮花器官变异进行观察, 获得彩图 1-2。

第三节 显微摄影技术、图像处理及图版制作技巧

一、显微摄影技术

显微摄影是指通过在显微镜下摄影, 将植物生殖过程的细胞及其内部结构形态放大成为肉眼可见的图像或图照, 是研究植物生殖生物学和细胞遗传学的重要技术。传统摄影技术是先采用胶片照相机拍摄, 然后进行胶片显影, 最后晒成照片, 整个程序较为复杂。目前主要采用数码 CCD 捕获图像并直接传入电脑存储, 以供直接观看和发表。数码 CCD 显微摄影的应用大大推进了植物生殖生物学和细胞遗传学的研究进展。由于考虑到目前还有研究者使用胶片照相机进行显微摄影, 所以本节先以 Olympus BH-2 万能生物显微镜为例介绍胶片显微摄影技术, 然后以配有 Nikon 数码 CCD 的 Leica DMRXA 万能显微镜为例介绍数码显微摄影技术。

1. Olympus BH-2 万能生物显微镜胶片显微摄影步骤

(1) 在显微摄影前调好科勒照明

按照第一节介绍的方法调好科勒照明, 否则难以获得清晰图像。

(2) 选定拍照的目标

移动载物台, 将要拍照的部位移到视野中央。

(3) 适当调低孔径系数

为了获得反差较好的图照, 可以按照所用物镜孔径系数的 70% (即物镜孔径系数 $\times 70\%$) 调节孔径光阑环上的系数。如 $40\times$ 物镜的孔径系数为 1.4, 那么拍照时孔径光阑环上调的系数为 $1.4 \times 70\% = 0.98$ 。

(4) 调节曝光系数

根据视野内观察目标的面积调节曝光系数。一般来讲, 样本占满了整个视野 (如子房切片等), 那么曝光系数调为 1; 样本的面积占整个视野的 50% 左右 (如观察游离的花粉粒等), 曝光系数调为 0.5; 样本的面积占整个视野的 10% 左右 (如吉姆赛染色的染色体压片等), 曝光系数调为 0.25。对荧光染色的样本拍照时, 由于其背景是黑色的, 而且占据主要的观察视野, 所以曝光系数调为 2。

(5) 调节胶片感光度

调节摄影控制器使之与所选用品牌胶卷感光度相一致。

(6) 选择胶片倒易律补偿值

一般情况下,调到1。

(7) 调节摄影目镜的屈光度

右眼对准摄影目镜,旋动摄影目镜上的屈光度校正环,直至视野内可见清晰的双线十字架为止。

(8) 摄影对焦

右眼对准摄影目镜,调节细调,直至看到清晰的图像。

(9) 摄影

先把电压调高,一般要到或超过指定的曝光电压(即显微镜基座上电压显示盘电压指示在“P”或之后),具体的电压数可以参照摄影控制器上显示的曝光时间确定。一般来讲,曝光时间控制在0.1~1 s。有些背景较暗的材料,曝光时间可能要长些。调好电压后,按动摄影控制器上的曝光按钮即可。

2. Leica DMRXA 万能显微镜数码摄影步骤

Leica DMRXA 万能显微镜可以配置不同型号的数码 CCD,不同型号的数码 CCD 的摄影程序可能有所不同。本节以配有 Nikon U5 数码 CCD 的 Leica DMRXA 万能显微镜为例介绍数码显微摄影技术。

(1) 开机

先打开数码 CCD 控制器的开关,然后打开显微镜,最后打开连接数码 CCD 控制器的电脑。电脑启动完毕,打开 Nikon CCD 数码摄影图像捕捉软件。

(2) 调节显微镜和观察

参照第一节有关的内容。

(3) 打开光路和浏览图像

先打开通往数码 CCD 的光路,然后点击“Live with quality”图标,浏览样本的图像,利用显微镜细调对显示屏上的图像进行对焦,直至看到清晰图像为止。如需要加标尺,可以在此时加上。

(4) 捕获图像

点击“Capture with automatically”图标,即可获得图像,接着以 JPEG 格式存储图像。

(5) 图像处理

一般的情况是将捕获的图像转到 Adobe Photoshop 图像软件进行处理。当然,也可以利用数码 CCD 本身配带的或另外购置的其他软件进行图像处理。

二、图像处理及图版制作技巧

图像处理的软件有多种,目前最常用的是 Adobe Photoshop 图像软件。Photoshop 是美国 Adobe 公司开发的真彩色和灰度图像编辑和处理软件,具有图像大小调整、剪切修饰、叠加合成、增加文字注释、颜色调整和拼合等功能,很适合显微图像处理和图版的

编辑。下面介绍利用 Adobe Photoshop CS 图像软件进行显微图像处理和图版制作的主要步骤, 以及图版制作的一些技巧。

1. 图像处理

原始显微图像往往存在一些不完美之处, 如背景中存在一些非目标性的杂质、图像亮度不够、反差不强等瑕疵。为了图版的美观, 一般需要对杂质进行消除, 对图像的亮度和反差进行调整。通过这些处理, 可以对图像进行一定程度的美化, 清楚显示作者要表达的结果。值得注意的是, 显微图像处理和美化不是艺术创作, 不能按照作者对结果的需要进行非真实性的修改或增加非本研究的结果, 需要遵循科学性、真实性和科学道德的原则。

(1) 去除背景中的杂质

可以采用两种办法: 方法①是采用 Photoshop CS “橡皮擦工具 (E)”。先点击“橡皮擦工具 (E)”图标, 再点击上方第 2 行横向图标“画笔”调整主直径, 主直径大小取决于杂质的大小。然后, 将鼠标对准杂质点击, 就可去除杂质。如一次未去除干净, 可进行多次, 直至杂质擦除干净。此法仅限于背景为纯白色或深黑色的图像, 其他的情况, 只能采用第二种方法。方法②是采用“仿制图章工具 (S)”。先点击“仿制图章工具 (S)”, 再点击上方第 2 行横向图标“画笔”调整主直径, 主直径大小取决于非杂质的背景和杂质本身的大小, 然后将鼠标对准非杂质背景, 按住“Alt”键, 点击鼠标, 再将鼠标对准杂质点击就可去掉杂质, 如杂质未去除干净, 可按照同样的步骤进行多次, 直至杂质去除干净。此法也可以用于图像局部非修改性 (不改变图像原有结构或不影响原图像反映的内容等) 修整或修复。

(2) 亮度调节和反差调整

在 Photoshop CS 软件中打开原始显微图像, 先点击菜单中“图像 (I)”图标, 在下拉菜单中选择“调整”图标, 再从右菜单中选择“亮度/对比度”图标, 点击该图标, 即出现“亮度/对比度”的新窗口, 先选择窗口中的“预览”, 以便能对调整效果直接进行判断。然后, 对准亮度游标拖动, 即可以调整亮度; 对准对比度游标拖动就可以调整对比度。调好后, 选择窗口中的“确定”按钮即可。

2. 图版制作步骤和技巧

图版制作质量在某种程度上影响着植物生殖生物学和细胞学研究的水平。一篇高质量的研究论文, 其图版质量也应该是高的。本部分结合作者多年的工作经验, 介绍有关图版制作的步骤和技巧。

图版制作的步骤主要包括: 原始图像的选择、处理、分辨率和大小调整、复制粘贴和初步排列、单张图像大小的一致化 (拼合) 复制和粘贴再排列、图像序号设计和图中关键部位的指示 (加箭头和字母等)、标尺添加、完整图版的复制和再粘贴, 最后通过 JPEG 格式以最佳图像质量存储。以上每个步骤完成后最好马上以 PSD 格式存储成单独的文件, 前后不要覆盖, 以便能利用之前的图版进行修改。

(1) 图像的选择

选择好的原始图像是制作高质量图版的关键。一般来讲, 为了尽可能捕捉到各种变化或是连续的发育过程, 需要录取大量的原始图像, 比如, 我们在研究同源四倍体水稻

花粉母细胞减数分裂期间的超微结构变化时，一共录了 3000 多张图像。要从数量如此众多的原始图像中挑出有价值的清晰图像需要一些技巧和耐心。

第一步，需要对正常对照（如正常二倍体水稻花粉母细胞减数分裂期间的超微结构变化）进行细致研究分析，结合已有的文献，熟悉各阶段的主要特点，并将各阶段有代表性的图像找出来，按照发育的前后顺序进行排列，利用不同的文件夹存放不同时期的图像文件。

第二步，按照正常发育的阶段，将同源四倍体水稻的图像进行分类排列和重新存储。

第三步，利用图像预览功能对每个阶段的图像进行单独比较分析，从中精选具有代表性的清晰图像并单独存储。

第四步，参照前述的图像处理方法，对挑出的图像进行处理。再按照下面的步骤进行排版。

如果采用焦卷相机拍摄，照片的选择步骤和图像基本是一样的。不同之处在于，照片选择之后的排版只能手工操作，比较繁琐。如果可能的话，最好利用扫描仪对挑好的照片进行高分辨率（600 dpi 或以上）扫描，把照片转换成数码图像，那么就可以按照同样的方法进行处理和排版了。

（2）图像分辨率和大小调整

打开 Photoshop CS 软件，选定并处理好第一个图像，点击上方“图像”菜单，在下拉菜单中点击“图像大小”，出现图像大小新窗口，先改变图像大小。通常情况是用来排版的图像比原始图像小，所以图像需要缩小。如果 A4 页面图版的每行排 3 张图像（页面图像总宽度为 18 cm），那么单个图像宽度可缩到 6 cm，其高度自动选定（在图像大小窗口下方选择约束比例即可）。然后，改变分辨率。原始图像的分辨率通常不是太高，为了获得分辨率好的图版，在缩小图像大小的同时，需要提高分辨率，使图像不会因缩小而出现“马赛克”，能保持清晰度。我们的经验是，如果图像缩到 6 cm，分辨率可以提高至 300 ~ 600 像素/英寸。需要说明的是，图像的分辨率是决定图像质量的最重要因素，如果可能的话，在显微镜操作时，应尽可能采用高分辨率（1024 × 1024 或以上）录取图像，因为在后续的处理中，只会降低分辨率，不会真正提高分辨率。

（3）复制粘贴和初步排列

第一步，新建一个画布（以 P 表示，下同），点击“文件”菜单，在下拉菜单中点击“新建”，出现新窗口，选择点击“好”，即出现新画布。由于此画布分辨率和大小是按照之前的格式自动设置的，所以还需要进一步调整其分辨率和大小。点击“图像”菜单，在下拉菜单中点击“图像大小”，在新出现的窗口中先改变分辨率，大小与上面单张图像的一致，然后取消“约束比例”，改变画布大小，大小可以参照 A4 复印纸的尺寸，即宽度 21 cm，高度 30 cm。

第二步，复制与粘贴，选择已打开并处理和调整后的单张图像，利用“矩形选框工具（M）”在单张图像中框定所需要的图像部分，点击“编辑”，在下拉菜单中点击“复制”。激活（点击）画布 P，点击“编辑”，在下拉菜单中点击“粘贴”，点击“移动工具（V）”，将鼠标对准新画布 P 中的图像，拖动图像至画布 P 左上角顶角排好，存