



• 生命科学实验指导拓展性系列教材 •

植物学实验指导

BOTANICAL
EXPERIMENT

曹建国 戴锡玲 王全喜 编著



科学出版社

生命科学实验指导拓展性系列教材

植物学实验指导

曹建国 戴锡玲 王全喜 编著

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书可作为高等师范院校新世纪教材《植物学》的配套教材。全书内容分植物学基本实验技术和植物学实验两部分,基本实验技术部分详细介绍了显微镜及其操作技术,常用的植物制片技术,生物绘图技术,植物材料的采集、培养和保存等内容;实验部分共设计了23个实验,包括18个基础性实验,5个综合性、研究性实验。本书还附有植物学实验常用仪器和实验试剂的配制方法。

本书可供高等院校生命科学相关专业学生使用,也可作为教师参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

植物学实验指导 / 曹建国,戴锡玲,王全喜编著.

—北京:科学出版社,2012.9

生命科学实验指导拓展性系列教材

ISBN 978-7-03-035153-1

I. ①植… II. ①曹… ②戴… ③王… III. ①植物学
—实验—高等学校—教学参考资料 IV. ①Q94-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第162058号

责任编辑:朱 灵 封 婷 / 责任校对:刘珊珊
责任印制:刘 学 / 封面设计:殷 靓

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

上海锦佳印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012年9月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2012年9月第一次印刷 印张:8 1/2

字数:179 000

定价:42.00元

前 言

Preface

植 物 学 实 验 指

植物学是生物科学中的一门基础课程,植物学实验也是生物学专业的一门基础性实验课程,开好植物学实验对传授专业知识、培养学习兴趣、提高实验技能具有重要的意义。传统的植物学实验强调验证和巩固课堂教学所获得的理论知识,忽视了对学生基本能力的培养和学习兴趣的激发,不利于提高学生的独立分析和综合研究能力。为此,我们在多年教学实践的基础上,对植物学实验进行了改革,编写了本实验指导。

本书在参考多种植物学教材和实验指导的基础上,依据上海师范大学新修订的《植物学实验教学大纲》的要求,结合本地区自然状况及我校教学的实际情况,并总结了我们多年来的教学和科研经验编写而成。

本书的实验设计分为植物学基本实验技术和植物学实验两大部分,前一部分重点介绍显微镜操作和使用、制片技术、绘图技术、植物材料培养等基本实验技术;后一部分又可分为基本技能实验、观察验证性实验、研究性实验和综合性实验四种类型。基本技能实验侧重于培养学生的基本实验技能,如显微镜的使用,绘图,植物切片的制作、检索表的编制等,该类型实验通常与观察验证性实验相结合,但侧重点有所不同。观察验证性实验主要侧重于培养学生的理论和实践相结合的能力,使学生能够把理论上学到的知识通过实践的方法加以验证。研究性实验主要培养学生进行科学研究的能力,针对某一问题进行实验设计,得出研究成果,并提交研究报告。综合性实验是综合运用所学的知识进行问题的总结和分析,设计研究课题,进行科学研究或调查,得出研究成果,并进行讨论和分析,主要培养学生的综合研究能力。

全书共设计了23个实验,每次实验2~3学时,由于实验数量较多,教师可根据实际情况进行选择或合并。

因编者水平有限,纰漏和错误在所难免,请专家、老师和同学批评指正。

编者

2012年6月



Contents

目 录

物 学 实 验 指 导



前言

第一部分 植物学基本实验技术

1 光学显微镜及其操作技术	2
1.1 光学显微镜的基本结构和成像原理	2
1.2 常用光学显微镜的种类	3
1.3 显微测量技术	6
2 常用的植物制片技术	8
2.1 临时封片和徒手切片	8
2.2 石蜡切片	9
2.3 整体封固制片	11
2.4 组织离析制片	13
2.5 分生组织压片	13
2.6 植物材料的整体透明技术	14
3 生物绘图技术	16
4 植物实验材料的准备	18
4.1 种子植物实验材料的准备	18
4.2 孢子植物实验材料的准备	19

第二部分 植物学实验

5 植物细胞与组织	24
实验 1 显微镜的使用及植物细胞的观察	24
实验 2 植物细胞的结构与代谢产物	26
实验 3 植物细胞的分裂	29
实验 4 植物的成熟组织	32

6 孢子植物	35
实验 5 藻类植物	35
实验 6 菌物	40
实验 7 苔藓植物	43
实验 8 蕨类植物	49
7 种子植物形态结构和发育	54
实验 9 双子叶草本植物营养器官的观察	54
实验 10 单子叶植物营养器官的观察	60
实验 11 木本植物营养器官的观察	65
实验 12 植物营养器官形态类型及其变态的观察	68
实验 13 花的形态结构及发育	74
实验 14 种子和果实的观察	79
8 种子植物分类	84
实验 15 裸子植物	84
实验 16 被子植物分类 I——双子叶植物纲(离瓣花类)	88
实验 17 被子植物分类 II——双子叶植物纲(合瓣花类)	92
实验 18 被子植物分类 III——单子叶植物纲	96
9 综合性、研究性实验	101
实验 19 浮游植物调查及其与环境关系的分析	101
实验 20 蕨类植物配子体发育及其影响因素的研究	106
实验 21 蕨类植物孢子形态观察研究	109
实验 22 植物叶片特征及其对环境的适应	112
实验 23 校园植物的调查研究	113
参考文献	116
附录 1 校园常见植物名录	117
附录 2 常用植物学教学实验仪器	120
附录 3 常用植物学实验试剂的配制	121
图版	

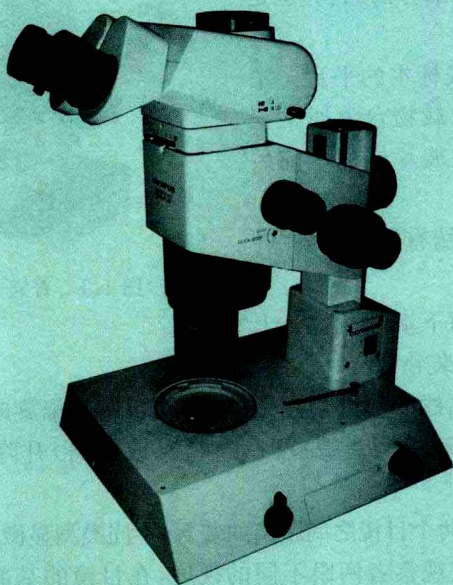
本教材可作为高等院校生物学

专业及相关专业在植物学课程中

的教学参考书或讲义

第一部分

植物学基本实验技术





光学显微镜及其操作技术

1.1 光学显微镜的基本结构和成像原理

1.1.1 普通光学显微镜的基本结构

普通生物用光学显微镜按照结构和功能可分为两大系统,即机械装置和光学系统(图 1.1)。

1. 机械装置

镜座: 位于显微镜的底部,用来支持显微镜的其他部分,稳定镜身。

镜臂: 连接镜座和其他部分的结构,也是用手握镜的部位。

载物台: 放置载玻片或标本的平台。中央有通光孔;高级显微镜的载物台上通常安装有载玻片推进器,可使载玻片或标本前后左右移动。

镜筒: 上端装目镜,下端有转换器,在转换器上装有物镜。

物镜转换器: 位于镜筒下端,圆盘状,上面通常有 5 个圆孔,用于安装物镜。

调焦螺旋: 分为粗调焦螺旋和细调焦螺旋,转动粗调焦螺旋时载物台升降的幅度大,用于低倍物镜调焦时使用;转动细调焦螺旋时载物台(或镜筒)升降的幅度小,用于高倍物镜调焦时使用。

眼距调节装置: 为调节两个目镜之间距离的装置,不同类型显微镜有所不同。

视度调节装置: 为适应观察者两眼不同的视度,在目镜的基部有一个调节圈,通过调节该装置可以使观察者两眼都能清晰地观察到物像。

2. 光学系统

光源和集光器: 高级生物光学显微镜,自身都配备了集光器,内有电光源,可通过调节电流的强弱来调节光线的强弱。有些光学显微镜在集光器上方还装有视场光阑,用来调节视野的大小。

聚光器: 该装置置于光源和载物台之间,高级光学显微镜聚光器内具有孔径光阑,也称为虹彩光圈,简称光圈,光圈可用来调节光线的强弱,大光圈,光线强,视野亮;小光圈,光线弱,视野暗。

物镜: 是显微镜最重要的光学部件,安装在物镜转换器上,规格通常有 4 倍($4\times$)、10



图 1.1 普通光学显微镜的基本构造

倍(10×)、20倍(20×)、40倍(40×)和100倍(100×),其中100×的为油镜,使用时物镜与盖玻片之间要加香柏油,以提高分辨率。物镜上的数字表示镜头的主要性能参数,如10倍镜头上的数字有:“10/0.25”和“160/0.17”。它们的含义是:“10”表示放大倍数,“0.25”表示镜口率(或称数值孔径,numeric aperture,数值越大分辨率越高);“160”为镜筒长度(mm),“0.17”为所要求的盖玻片厚度。物镜的齐焦:当用某一倍率的物镜观察图像清晰后,再转换另一倍率的物镜时,其成像应基本清晰,即齐焦。物镜的合轴:物镜转换时,像的中心应在视野中央允许的范围内,即合轴。齐焦性能的优劣和合轴的程度是显微镜质量好坏的重要标志。由齐焦可知,当用低倍物镜观察清晰后,换用高倍物镜观察时,只需调节细调焦螺旋即可。由合轴可知,在低倍镜找到目标后,要将其置于视野中央,换高倍镜观察时,观察对象仍然在视野中央。

目镜:装在镜筒的上端,规格通常10×、16×等。

1.1.2 显微镜的成像原理

显微镜的工作原理主要是根据透镜的成像原理进行设计制作的,即当物距 $2f > u > f$,成倒立的放大的实像;当物距 $u < f$,成正立的放大的虚像。要放大的物体位于物镜的前方2倍焦距和焦距之间,经过物镜的放大作用在目镜的焦点之内形成一个放大的倒置的实像,这个实像在目镜的同侧形成一个放大的虚像(图1.2)。

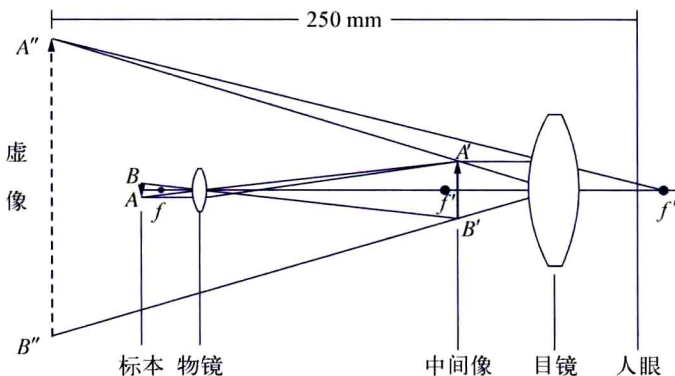


图 1.2 显微镜的工作原理

通过物镜、目镜等光学器件构成放大光路,使所得虚像 $A''B''$ 的距离恰好等于人眼的明视距离——250 mm,获得将标本放大的虚像。当物体物距为252 mm时,在视网膜上成的像最清晰,我们称该距离为“明视距离”。

1.2 常用光学显微镜的种类

1.2.1 明视野显微镜

明视野显微镜(bright field microscope)也叫明视场显微镜,是生物学领域最常用的显微镜。明视野显微镜不对光的性质作任何改变,只能通过调节焦距、聚光器位置和孔径光

阑来调节物像的清晰度,标本通常需要染色方能观察清楚。

1.2.2 暗视野显微镜

暗视野显微镜(dark field microscope)是根据丁达尔(John Tyndall)效应设计的。原理

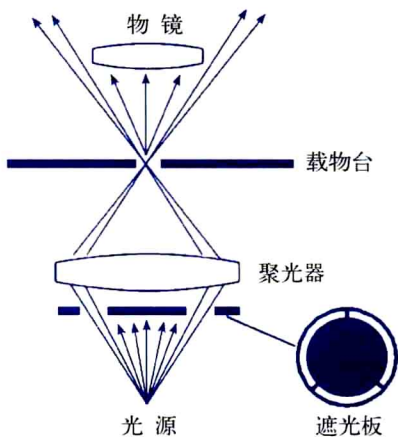


图 1.3 暗视野照明方式

是在暗的环境中微小的颗粒容易发生光的散射和衍射而呈现出明亮的结构。在暗视野显微镜的聚光器中央有遮光板(dark-field stop),其边缘有一狭缝,它能使照明光线不直接进入物镜,只能通过狭缝斜向照射到被检物体上,被照射标本的表面产生散射和衍射光进入镜头后,成为映衬在黑色背景下的明亮图像(图 1.3)。利用这种显微镜能观察到小至 4~200 nm 的微粒子,分辨率比明视野显微镜高 50 倍左右。但用这种方法观察标本时,只能观察到物体的存在与否、运动及外部形态,很难分辨出内部的细微结构。使用暗视野显微镜时要注意光轴调节,保证载玻片和盖玻片无瑕疵和灰尘,物镜镜头也必须干净。

1.2.3 相差显微镜

相位差是指两个波的相位之差,光在传播过程中也存在相位和相位差。当光波经过小颗粒物质时会产生光的衍射现象,产生了直射光和衍射光,两者之间也存在着相位差,当两者在传播过程中相遇时会发生光的干涉现象,如果直射光和衍射光的相位相同,光的振幅增大,亮度增大;如果直射光和衍射光的相位相反,光的振幅减小,亮度降低。这样,由于直射光和衍射光的相位不同而导致光的振幅不同,从而形成视野中的亮区和暗区,使标本反差增大,易于观察,这就是相差显微镜的光学原理。

在普通显微镜中也存在着直射光和衍射光,为了使直射光和衍射光的相位达到重合或者使两者的相位相反,即可达到正干涉和负干涉的目的。相差显微镜在构造上增加了环形光阑和相位板两个特别的组件。环形光阑(annular diaphragm),位于光源与聚光器之间,作用是使透过聚光器的光线形成空心光锥,聚焦到标本上,能够使标本产生直射光和衍射光。相位板(phase plate),位于物镜内,相板可以分为两部分,圆形相位板的周围是共轭面,可通过直射光,中间是补偿面,可通过衍射光。相位板涂有氟化镁,可将直射光或衍射光的相位推迟 $1/4 \lambda$,使两者的相位相同或相反,从而达到干涉的目的,形成明显的相差(图 1.4)。

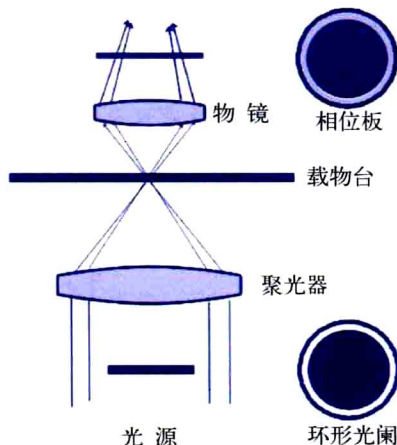


图 1.4 相差显微镜照明原理

1.2.4 微分干涉差显微镜

微分干涉差显微镜(differential interference contrast microscope, DIC)又称 DIC 显微镜。也是利用标本的折射率不同把光的相位偏移(phase shift)转换成可被检测的振幅差。与相差显微镜不同之处是 DIC 显微镜利用偏光干涉的原理制造,技术要复杂得多。构成 DIC 显微镜光学组件有:偏振器(polarizer)、DIC 棱镜、DIC 滑翔器和检偏器(analyzer)。

1.2.5 荧光显微镜

荧光显微镜(fluorescence microscope)是根据“光化荧光”原理而设计制造的显微镜。引起荧光最有效的光是近紫外光区的紫外光,其波长范围为 320~400 nm。荧光现象的实质是荧光物体吸收了短波光的能量,又以发光的形式产生波长较长的荧光,荧光的波长接近于红光的波长。荧光显微镜通常以紫外线为光源照射被检物体使其发射出荧光。

1.2.6 倒置显微镜

倒置显微镜(inverted microscope)是将普通显微镜的物镜与照明系统颠倒,照明系统在载物台上方,物镜在载物台之下。倒置显微镜用于组织培养、细胞离体培养、显微操作等方面。它要求物镜和聚光镜的工作距离较长,以便能直接对培养皿中物体直接观察。一般显微镜的 40×物镜的工作距离大约在 0.6 mm,而倒置显微镜 40×物镜的工作距离可以达到 7.4 mm。倒置显微镜的聚光器工作距离可达到 55 mm,使用起来很方便。

进入 20 世纪 80 年代以来,光学显微镜的设计和制作又有了很大的发展,其发展趋势主要表现在注重实用性和多功能性。在装配设计上趋于采用组合方式,如高级的显微镜集普通光镜、相差、荧光、暗视野、微分干涉、摄影等装置于一体,从而操作灵活,使用方便。

1.2.7 激光共聚焦显微镜

激光共聚焦显微镜(laser confocal scanning microscope)用激光作扫描光源,逐点、逐行地快速扫描成像,扫描的激光与荧光收集共用一个物镜,物镜的焦点即是扫描激光的聚焦点,也是瞬时成像的物点。由于激光束的波长较短,光束很细,所以激光共聚焦扫描显微镜有较高的分辨力,大约是普通光学显微镜的 3 倍。系统经一次调焦,扫描限制在样品的一个平面内。调焦深度不一样时,就可以获得样品不同深度层次的图像,这些图像信息都存储于计算机内,通过计算机分析和模拟,就能显示细胞样品的立体结构。激光共聚焦扫描显微镜既可以用于观察细胞形态,也可以用于细胞内生化成分的定量分析、光密度统计以及细胞形态的测量。

1.2.8 实体显微镜

实体显微镜(stereo microscope)又称为体视显微镜、解剖镜等,它是一种具有正像立体感的显微镜。这类显微镜的放大倍数较小,可在较大的视野范围内观察标本,并且观察到的像为正像,与人眼视觉效果相同,故被广泛地应用于生物学各领域。

实体显微镜的机械部分由镜座、镜臂、镜筒、调焦螺旋等部分构成。实体显微镜的光学

系统包括初级物镜、中间变焦镜、转换棱镜和目镜等。其原理是由一个共用的初级物镜对标本成像后,光束被两组中间变焦镜(或称中间物镜)分开,两组中间物镜的观察角度不同,它们之间的夹角称为体视角,一般为 $12^{\circ}\sim 15^{\circ}$,最后光线再经各自的目镜成像,因此所成的像具有三维立体感。也有的实体显微镜是由两个单镜筒显微镜并列放置组成,两个镜筒的光轴构成的夹角相当于人们用双目观察一个物体时所形成的视角,因此,观察到图像具有立体感(图 1.5)。

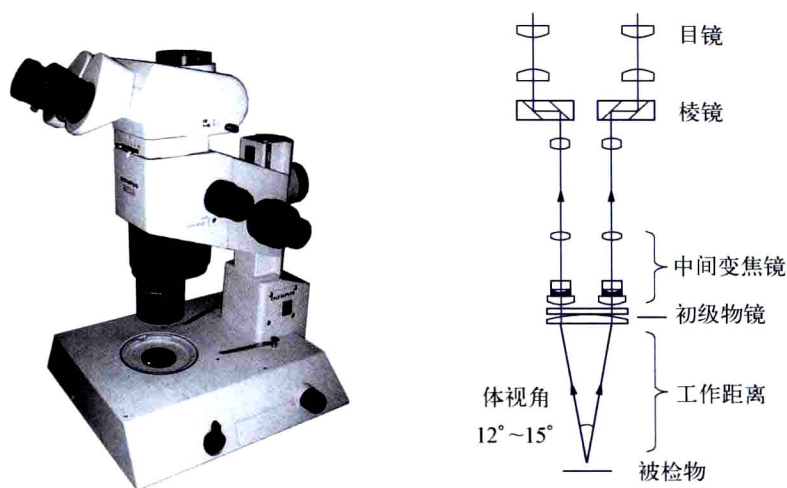


图 1.5 实体显微镜及其原理示意图

现代的实体显微镜制作精度越来越高,放大倍率也越来越大,并且可根据实际的需要选配丰富的附件,如放大倍率更高的目镜和辅助物镜等。有的实体显微镜还可通过相机接口与数码相机、摄像头等电子设备相连接,接入计算机进行分析和处理。照明系统也有反射光、透射光照明;光源有卤素灯、环形灯、荧光灯、冷光源等。实体显微镜所具有的这些优点使它在工业生产和科学研究领域具有广泛的应用,比如在工业中用于微小零件和集成电路的观测、装配、检查等;在生物、医学领域用于标本观察、切片操作、显微外科手术等。

1.3 显微测量技术

显微测量是在显微镜下测量生物体细胞或组织结构的大小的方法。显微测量是用微量尺来测定材料大小的,微量尺由目微尺(目镜量尺)和台微尺(载物台量尺)两部分构成。

目微尺:为一圆形玻片,中央长 1 cm 的部分有极为精确的平行刻度(50 格或 120 格)。

台微尺:为一块特别的载玻片,中央装有圆形盖玻片,其上也刻有精细刻度,通常为 1 mm,精确等分为 100 格,每格等于 $1\% \text{ mm}$,即 $10 \mu\text{m}$ (微米)。

在测量标本前,必须分别计算好目微尺在 $4\times$ 、 $10\times$ 、 $20\times$ 、 $40\times$ 和 $100\times$ (油镜)下每格代表的长度值。

方法如下:取下接目镜,卸下目镜透镜,把目微尺放入接目镜镜筒内光阑上,再装上接

目镜。在视野中可看到刻度,每隔 10 格有一阿拉伯字母,如 10、20、30……100。注意字母是正面还是反面,如为反面,则取出目微尺翻转后再放入,即成为正面。

将台微尺放置于载物台上,在 $4\times$ 物镜下进行观察,将台微尺刻度调节到视野中央,再旋转目镜或移动台微尺,使目微尺和台微尺的刻度平行重合,移动台微尺,使台微尺的 0 点刻度线和目微尺的 0 点刻度线重合,再找目微尺的刻度线和台微尺主刻度线在其他小格刻度重合的地方,看目微尺和台微尺各有多少格,即可计算出目微尺的格值:

$$\text{目微尺的格值} = \text{台微尺格数} \times 10 \mu\text{m} / \text{目微尺格数}$$

例如,当我们把台微尺的 0 点和目微尺的 0 点在视野中重合时,发现台微尺第 9 格的刻度线和目微尺的第 5 格的刻度线重合(图 1.6),则可算出目微尺每一格的长度为 $9 \times 10 \mu\text{m} / 5 = 18 \mu\text{m}$ 。即在此接目镜与接物镜的放大倍数下目微尺每格为 $18 \mu\text{m}$ 。同理,可测出 $10\times$ 、 $20\times$ 、 $40\times$ 和 $100\times$ 下目微尺每格代表的长度值,然后就可移去台微尺,换上准备观察的材料,则可根据目微尺的格值计算出标本的大小。



图 1.6 显微镜下的台微尺和目微尺

2

常用的植物制片技术

制片是观察植物内部形态结构的主要方法之一,植物学实验常用的有临时封片、徒手切片、石蜡切片、整体封固、组织离析技术、压片等制片技术和整体透明技术。

2.1 临时封片和徒手切片

2.1.1 临时封片

无论何种植物材料均需做成装片置于显微镜下观察,临时封片是观察植物材料内部结构的简易方法,其特点是容易制作,原色观察和方便简洁,临时封片尤其适合观察活体材料。制作临时封片的基本方法是:①准备好载玻片、盖玻片,擦拭时要小心,以免弄碎玻片;②在载玻片的中央滴一滴蒸馏水,用镊子夹取或解剖针挑取植物材料置于水滴上,并使材料展开或分散均匀,充分浸润水分,同时要避免产生气泡;③盖上盖玻片。方法是用镊子夹住盖玻片的一边,另一边用解剖针抵住,并与水滴的边缘接触,然后慢慢放下盖玻片,这样可避免混入气泡,如盖玻片下水分不足,可在盖玻片边缘适量添加水分,如盖玻片下水分过多,可用吸水纸吸掉多余的水。做好的封片可直接放在显微镜下观察,如制作的植物材料较薄,可适当调整显微镜光圈,增大反差,以便观察清楚。

2.1.2 徒手切片法

徒手切片法是研究植物结构的最常用的一种制片方法,它不需要使用任何机械设备,只需用双手操作,简单快捷,易于掌握。

1. 徒手切片的用具

双面刀片,选择质量好的刀片对获得高质量的切片非常重要;培养皿,用来盛装水;载玻片和盖玻片,用于制作临时封片;其他工具包括:毛笔、解剖针、镊子等;植物材料,选择的实验材料需要有代表性,软硬适当,便于切片。

2. 徒手切片的方法和过程

传统方法:用左手拇指和食指捏住材料,材料略高出拇指指尖,以免切时伤及手指。右手握住刀片,材料和刀片浸润水分以减少摩擦,切割时用臂力带动刀片自左前方向右后方做水平切割移动。切下多数切片后,用湿毛笔将切下的薄片转移到盛水的培养皿中,从中挑选薄而透明的切片,放在载玻片的水滴中,加上盖玻片制成临时制片即可进行观察。

切菜法:在徒手切片实践过程中,我们发现传统徒手切片技术并不容易获得良好的切片效果。而改用切菜法很容易获得良好的切片,具体操作方法为:①准备一个稍大的培养皿,里面盛装 $1/2$ 的水分;②准备适当大小的材料,如 $1\sim 2$ cm的植物茎、根、叶片等,置于盛有水的培养皿内;③左手食指和拇指按住材料使材料固定;④右手握住双面刀片,以切

菜的方式垂直切取材料数片,切片可直接浸润于水中;⑤用解剖针捞取透明的切片,放在载玻片的水滴中,加上盖玻片制成临时装片进行观察。切菜法的优点是容易获得薄的切片,切片不受材料硬度影响,稍柔软或坚硬的材料均可用此法切片。

3. 材料种类对徒手切片的影响

硬度适中的材料,如芹菜叶柄、空心莲子草的茎等可直接进行徒手切片;过于柔软的材料可置于胡萝卜、马铃薯等支持物内再行切片;过于坚硬的材料可经软化剂(50%乙醇+甘油=1:1)软化后再进行切片。

2.2 石蜡切片

石蜡切片技术是一项传统的生物制片技术,至今已有一百多年的历史,现广泛应用于植物学教学和各种科学研究中。制作石蜡切片的主要过程包括:①取材;②固定;③脱水;④包埋;⑤切片;⑥染色;⑦封固。

2.2.1 石蜡切片所需的药品和仪器

固定剂:用于植物材料固定所需的药品通常有乙醇、福尔马林、醋酸、苦味酸、铬酸、重铬酸钾、氯化汞、氯仿、钨酸等。

脱水剂:常使用乙醇(95%和100%的乙醇)。

透明剂:常使用二甲苯。

包埋剂:常使用石蜡。

粘片剂:明胶。

封固剂:加拿大树胶。

仪器及用具:切片机、烘箱、恒温箱、恒温台、染色缸、烧杯、玻璃棒、毛笔,载玻片、盖玻片等。

2.2.2 石蜡切片主要过程

1. 取材

根据研究的目的,决定取材的部位。取材时要考虑切片的方向和定位,如植物的根、茎、叶横切可观察到整体结构,纵切可观察导管和筛管结构;花药常用横切;子房横切可观察胎座着生位置、胚珠着生方式等,纵切可观察胚珠、胚囊、心皮、花柱、柱头的构造,尤其是胚囊中细胞的排列,花柱中花粉管的伸长等。

2. 固定

固定是用固定液(多种化学药剂配制而成)浸渍新鲜材料,迅速杀死或沉淀细胞中的生活物质,终止细胞的一切代谢过程。常用的固定剂包括:卡诺(Carnoy)固定液,配方为无水乙醇(或95%)75 ml+冰醋酸25 ml,此固定液穿透速度非常快、固定力强,对细胞核固定效果良好。福尔马林-醋酸-乙醇混合固定液(FAA),配方为福尔马林10 ml,冰醋酸5 ml,95%乙醇85 ml,这种混合固定液通常简称“FAA”固定液,固定时间在6 h以上即可达到良好的固定效果。固定剂用量一般为固定材料体积的10~15倍。具有表皮毛的材料,可先用

2. 固定液

卡诺固定液固定 10~15 min, 然后转入其他固定液固定。较大的材料固定时应先抽气。

3. 脱水

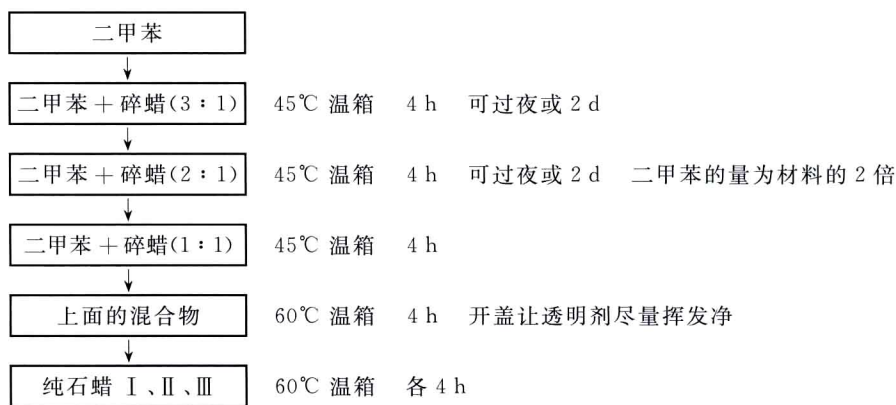
乙醇是石蜡切片最常用的脱水剂, 它可与水在任何比例下相混合, 乙醇的脱水能力比较强, 又能硬化组织, 由于乙醇对组织会有明显的收缩作用, 因此在以乙醇作为脱水剂时, 应该先从较低浓度的乙醇开始, 逐渐递增其浓度, 这样可避免组织快速收缩, 发生变形。第一级乙醇浓度随固定剂中乙醇浓度而定, 如常规 FAA 固定, 可从 70% 乙醇开始, 再经 80%, 95% 以至无水乙醇。Carnoy 固定, 材料经过 70%, 80%, 90%, 95%, 以至无水乙醇的脱水程序, 即可达到脱水的要求。乙醇脱水时间依材料大小而定, 如材料小于 2 mm^3 , 每级 2~3 h 脱水一次; 切片脱水通常间隔 5 min。

4. 透明

由于常用的脱水剂乙醇不能与石蜡混溶, 因此必须使用一种既能与乙醇又能与石蜡相混溶的媒剂, 把组织中的乙醇取代出来, 二甲苯就是这样一种媒剂, 它既能与乙醇混溶, 又能与石蜡混溶。使用二甲苯替代乙醇时, 可发现组织材料的折光性改变, 呈透明状态, 因此称为透明, 这种媒剂就称为透明剂。透明时间的长短因组织的大小而异, 最好先投入乙醇和二甲苯等量混合液 30 min, 再入纯二甲苯, 并更换一次纯二甲苯, 待组织完全透明后进行浸蜡, 一般需要 30 min 以上。

5. 浸蜡

组织材料经二甲苯的透明作用之后, 移入融化的石蜡内浸渍, 石蜡逐渐浸入组织间隙, 取代透明剂, 这一程序就叫浸蜡。浸蜡需要根据所用石蜡的熔点来定, 在温箱内进行, 其主要过程如下:



6. 包埋

包埋, 就是将已经浸蜡的组织材料从蜡浴取出, 置入充满熔融状态石蜡的纸盒内或包埋板内包埋成块, 使组织和包埋剂相熔一体并迅速冷却, 以便获得石蜡块, 这个程序称为包埋。

7. 修块和切片

包埋的材料经冷却后获得包埋板, 首先要将包埋的材料分割成块, 每块含有一个植物样品。取一块分割好的石蜡块, 将材料粘贴在事先准备好的木块上, 这样可方便修块和切

片。蜡块整修的目的是将包埋的材料暴露于蜡块上表面,修整蜡块时只能一点一点地切掉蜡边,否则会使蜡块断裂露出组织,最终修好的蜡块应为基座较宽,上部较狭的梯形,蜡块上表面应为方形或梯形。

将修好后的蜡块固定于切片机头上的夹座内,调整到稍离开切片刀能够切到的位置上,以免误切使材料损坏。接下来是对刀,即使材料接近刀口,注意蜡块组织切面与切片刀口要垂直平行,对刀要细心,调整蜡块组织切面恰好与刀口接触,旋紧刀架,固定好机头。先粗修切片,然后连续切片,实践中可用右手转动切片机手轮,左手用毛笔托起蜡片,协调地进行切片操作。切下的切片带,一端用镊子轻轻拉起,尽可能将切片带拉直展开,用毛笔将切片带从刀口向上挑起,拉下切片带,然后轻拖铺于蜡片盒中保存。

8. 粘片

是将切好的蜡带粘贴到载玻片上的过程。首先将预先洗干净并干燥的载玻片涂上明胶粘剂,反复涂匀,载玻片置于43℃温台上,在载玻片上添加水分。用镊子截取部分蜡带,夹住蜡带的一边,将蜡带铺于载玻片恒温水中,注意蜡带光亮的一面应朝下,立即用毛笔轻轻拉展以切片无皱褶为最好。待切片在恒温水内充分摊开展平后,将载玻片多余的水吸掉,在玻片上仍有少量水时,用毛笔拨正切片位置。用铅笔在载玻片一端的毛玻璃上写上标本编号,字迹要清楚、明确。将附贴好的切片置于45℃温箱中干燥2 d,使蜡带与载玻片结合牢固,才可进行脱蜡染色;或置于60℃恒温箱内干燥2 h,蛋白质凝固后即可进行染色。

9. 脱蜡与染色

脱蜡是将切片上的石蜡溶解去除,以便对材料进行染色,染色是使不同组织或细胞不同部位着色,产生不同的折光率,使内部结构更清晰,便于观察。

脱蜡与染色的具体步骤如下:

脱蜡:将切片置于纯二甲苯溶液中经二甲苯Ⅰ,二甲苯Ⅱ,二甲苯Ⅲ三次脱蜡,每步5 min,可将切片上的石蜡彻底脱除。

过渡:二甲苯+乙醇(1:1),时间约5 min。

复水:无水乙醇Ⅰ,无水乙醇Ⅱ,95%,85%,70%,50%乙醇,蒸馏水,每步5 min。

番红染色:置于0.5%~1%番红水溶液染色2~24 h。

脱水:依次用30%、50%和70%的乙醇溶液脱水,每步20 min。

固绿复染:用0.1%固绿的95%乙醇溶液复染10~40 s。

继续脱水:用95%和100%的乙醇脱水。

透明:用无水乙醇和二甲苯混合液处理5 min,用纯二甲苯透明处理5 min。

10. 封片

切片需要用盖玻片封固方能进行观察,石蜡切片常用中性树胶、大马树脂及人工树脂等封片。其中中性树胶是很好的封固剂,折光率为1.52,与玻璃折射率相同,很薄一层时几乎是完全透明。配制中性树胶可将二甲苯调和到刚形成拉滴状,放到玻璃瓶中备用,封固时取一滴中性树胶滴在材料上,封固后的切片可在45°的温箱中干燥。

2.3 整体封固制片

整体封固法制片是植物学实验中常用的一种制片技术,它适用于微小的植物材料,如