



全国高等农业院校教材

全国高等农业院校教材指导委员会审定



植物显微技术

● 王灶安 主编

● 农学类专业用

农业出版社

全国高等农业院校教材

植 物 显 微 技 术

王灶安 主编

农学类专业用

农 业 出 版 社

(京)新登字060号

Q94-336

4.7

全国高等农业院校教材

植物显微技术

王灶安 主编

* * *

责任编辑 魏丽萍

农业出版社出版 (北京市朝阳区农展馆北路2号)

新华书店北京发行所发行 农业出版社印刷厂印刷

787×1092mm16 开本 10.75 印张 8 插页 218 千字

1992年10月第1版 1992年10月北京第1次印刷

印数 1—2,000 册 定价 5.00 元

ISBN 7-109-02182-3/Q·105

主 编 王灶安 (华中农业大学)
编 者 李和平 (华中农业大学)
李诗松 (华中农业大学)
主审人 杨弘远 (武汉大学)
审稿人 徐汉卿 (南京农业大学)

代 序

自从发明显微镜以来，人类对植物的研究就进入了微观世界，从而逐渐发展成一门技术——植物显微技术。它是研究植物细胞学、解剖学、胚胎学的必要技术基础，是农林、师范、综合院校植物学教学、研究的重要手段。近几十年来，各种类型的光学显微镜与电子显微镜相继问世，相应的制样、观察、记录方法日臻完善。因此，编写一本新的植物显微技术教材很有必要。

本书具有以下特色：第一，在内容上既反映了显微技术的较新成就，又注重切合当前教学实际需要。书中一、二两篇，在取材上均体现这一特点。例如在介绍制片技术时，以石蜡切片作为基础，辅之以半薄切片与超薄切片，而淘汰了比较过时的火棉胶切片。在介绍显微镜部分时，着重于基本结构、使用方法与保养知识，适当介绍荧光、相差、干涉差、偏光等专用技术。做到了推陈出新、讲究实效。第二，在方法上既遵循“少而精”的原则，又注意操作细节的发挥。把功夫放在基本原理与方法的阐述上，便于学生牢固掌握有代表性的技术，收“举一反三”之效。在重要环节上，不吝篇幅交代技术关键，尤其是介绍了编者多年积累的技术窍门与国内近年发展的新方法。这是单纯编译外国教材所达不到的。

希望本书的出版为我国植物学教学与研究作出应有的贡献。

杨弘远

1990年3月于武汉大学

前 言

本书是根据1988年农业部暨全国农业院校教材指导委员会会议精神，在基础学科组上讨论通过的植物显微技术教学大纲编写而成的。

植物显微技术是一门理论性及实践性较强的专业基础课。学习本课程为研究植物胚胎学、植物解剖学、作物栽培（农作物、果树、蔬菜、林木栽培）、遗传育种、生物技术等课程奠定理论基础，为教学、科研提供必备的技术。

本教材总学时数为80。教材内容有：植物制片技术（包括石蜡、半薄与超薄切片）、显微化学、显微摄影、光学显微镜与显微附属仪器的使用等内容。

自1977年开设植物显微技术课以来，历届学生普遍反映本课程系统性强，能联系教学、科研实际，教学效果良好，并受到校内外有关专家的好评。本书编写过程中总结了11年开设显微技术的经验，参考了国内外显微技术书籍及近期科研工作的新方法、新技术。为了便于学生使用教材，特增绘较多的实物图。书中切片部分及显微镜的一部分插图由华中农业大学李琦同志绘制，显微镜部分插图由杨晓庄同志绘制。

为了拓宽知识面，提高实验和研究技术，我们将华中农业大学中心实验室兰盛银副教授等精心设计的MSP-A型生物样品显微制备仪及湖北医学科学院方万文高级工程师设计研制的显微镜“色偏振干涉差照明装置”（CPIC型）等都编入教材，为快速、安全制片和观察提供较好仪器。

本书编写过程中承蒙武汉大学杨弘远教授、周嫦教授、南京农业大学徐汉卿教授、华中农业大学兰盛银副教授、杨文森副教授审阅、提供资料，并提出宝贵意见，深表感谢。

本教材编写分工：第一篇一、二、三、四、五章由王灶安、李和平编写；六、七章由李和平编写；第二篇八、九、十、十一章由李诗松、王灶安编写；十二、十三章由王灶安、李和平编写。

由于我们的水平有限，错误和不当之处，恳请同行和读者批评指正。

编 者

1989年12月于华中农业大学

目 录

代 序 前 言

第一篇 植物制片的一般原理与方法

第一章 植物制片的方法及准备.....	1
第一节 植物制片的基本要求与主要制片方法.....	1
第二节 溶液的配制.....	2
第二章 石蜡法制片原理与方法.....	3
第一节 材料的选择与分割.....	3
第二节 杀生、固定及保存.....	4
一、杀生、固定及保存的概念.....	4
二、常用固定液的配制及使用.....	7
三、常用器具的准备.....	8
第三节 脱水.....	8
第四节 透明.....	8
第五节 浸蜡.....	9
第六节 包埋.....	10
第七节 切片.....	13
一、石蜡块的分割、整修与固着.....	13
二、切片机种类.....	14
三、切片刀的选择与准备工作.....	14
四、切片方法与出现问题的解决.....	15
第八节 粘片及展片.....	16
第九节 脱蜡.....	18
第十节 染料与染色.....	19
一、染料的分类.....	19
二、几种常用染料的性质及配制.....	19
三、染色原理简介.....	23
四、一般的染色方法.....	24
五、染色时应注意的事项.....	25
第十一节 封藏与封藏剂.....	26
第三章 石蜡制片实例.....	27
一、根尖纵切制片法.....	27
二、茎纵、横切片.....	29

三、叶横切片（或用于一般根、茎、叶、花药、子房等切片）	30
四、花芽纵切片制片	31
五、子房纵切片制片	32
六、花生子叶横切片	34
七、线粒体制片法——雷加特氏法	34
第四章 其他切片方法	35
第一节 滑走切片法	35
一、AO-860型滑走切片机的基本操作与构造	35
二、花生子叶切片（临时切片、PAS反应）	36
三、木材切片的方法	37
第二节 超声波快速制片	37
第五章 非切片制片法	38
第一节 细胞组织分离制片法	39
一、蚕豆或鸭跖草叶表皮制片	39
二、小麦叶表皮制片	39
三、木材解离制片	40
四、胚囊酶法分离技术	41
五、子房整体透明法	42
第二节 整体制片法	43
一、棉胚乳整体制片	43
二、水绵装片	44
三、团藻装片	44
四、黑根霉整体制片	44
第六章 植物显微化学制片	45
第一节 核酸的测定	45
一、Feulgen反应显示DNA法	45
二、甲基绿—派洛宁显示DNA和RNA法	45
第二节 细胞内含物的测定	46
一、碳水化合物的测定	46
二、蛋白质	47
三、脂肪的测定	49
第三节 细胞壁物质的测定	50
一、纤维素的测定	50
二、木质素的测定	51
三、角质和栓质的测定	51
四、皮昂涅兹氏测定	51
五、果胶质的测定	52
第七章 半薄切片与超薄切片法	52
一、半薄切片法	52
二、超薄切片法	57

第二篇 显微镜与显微摄影

第八章 显微镜的简介	61
第一节 显微镜的基本知识	61
一、透镜成像的基本知识	61
二、光路简介	62
三、机械部分	62
第二节 复式显微镜结构原理和分类	63
一、结构原理	63
二、显微镜的种类	65
第三节 显微镜常用的附加设备	66
一、推动器	66
二、显微描绘器	66
三、显微镜测量尺	68
第九章 显微镜的部件和性能	69
第一节 物镜和目镜	70
一、物镜	70
二、目镜	71
第二节 显微镜的性能	72
一、放大率	72
二、分辨率	72
三、视场	73
四、景深	74
五、亮度和清晰度	74
六、物镜的工作距	74
七、聚光镜和反光镜	75
八、光源	76
第三节 机械部件	77
一、镜体与镜臂	77
二、载物台	77
三、粗调机构	77
四、微调机构	77
五、物镜转换器	78
第四节 显微镜灰尘和油污的清除	78
第十章 光学部件疵病的诊断和维护	80
第一节 透镜产生疵病的原因和危害	80
第二节 光学部件的防霉和防雾措施	82
一、管理的技术措施	83
二、保护方法	83
三、除霉膏和防雾剂的使用	84
第十一章 几种显微技术的应用	84

一、荧光显微术	85
二、相差显微术	90
三、微分干涉术	92
四、偏光显微术	96
第十二章 显微摄影	99
第一节 摄影、印相、放大、幻灯片制作过程表解	99
第二节 显微摄影装置与使用	100
一、小型接触式显微摄影	100
二、国产ZA型显微摄影仪的使用方法	100
三、135照相机显微摄影	101
四、几种显微摄影自动曝光器使用法	102
五、奥林巴斯 (OLYMPUS) 万能显微镜及BH ₂ 型显微镜显微摄影	102
六、OPTON MC 63型相机与DRC型立体显微镜配套摄影法	105
七、Nikon AFX-Ⅱ型显微摄影控制盒的结构与使用	106
第三节 滤光 (色) 镜	108
一、滤光镜在显微摄影中的应用	108
二、滤光镜在室外摄影时的应用	108
三、滤光镜在彩色摄影中的应用	111
第四节 曝光	112
一、局部曝光试验	112
二、影响显微摄影曝光时间的因素	112
第五节 底片的种类性能与选择	113
第六节 常用摄影药液	115
一、显影药物的种类和性能	115
二、常用显影液的配制方法	116
三、停显、定影液	116
第七节 照片放大 (黑白)	117
一、放大机的结构和使用	117
二、影响放大感光的主要因素	118
三、放大镜头光圈作用和使用方法	119
四、放大时调节反差的各种方法	120
五、放大倍数的测定	121
第八节 印相	122
第九节 翻拍与幻灯片制作	123
一、翻拍	123
二、幻灯片制作	124
第十三章 植物显微特选技术	125
第一节 显微镜色偏振干涉差照明装置使用	125
第二节 生物显微样品自动脱水染色仪BDS-A	126
第三节 厚、硬材料处理简便法	128
第四节 几种特殊摄影方法介绍	128
第五节 压碎制片法	129

附录1: 几种常用固定药品的性质	136
附录2: 几种常用的脱水剂及脱水方法	141
附录3: 几种常用的透明剂及透明方法	142
附录4: 几种常用的粘贴剂与封藏剂、包埋剂	143
一、粘贴剂	143
二、封藏剂	143
三、包埋剂	144
附录5: 溶液的配制	145
附录6: 常用药品染色对象	150
一、植物组织染料	150
二、细胞染料	150
附录7: 常备器具、药品、仪器与木器	151
附录8: 偏光显微镜故障分析排除	154
附录9: 微分干涉术的故障分析与排除	156
附录10: 植物显微技术教学总进度表	156
主要参考资料	159

第一篇 植物制片的一般原理与方法

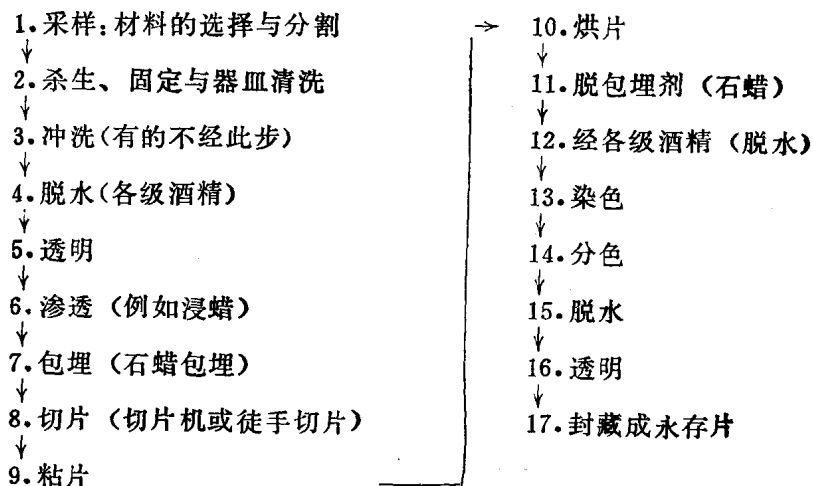
第一章 植物制片的方法及准备

植物制片技术是植物显微技术课的一个重要组成部分。在有关植物形态建成、植物杂交育种、作物病虫害防治、药用植物的培育和鉴别,以及林木材性鉴定等多方面的研究和教学工作中,都需要应用显微制片技术,由于各种作物器官的性质差异以及研究目的的不同,就需要不同的制片方法,但因限于学时及篇幅,本书仅根据常用的基本原理及教学中行之有效的办法加以介绍。

第一节 植物制片的基本要求与主要制片方法

植物内部结构不能用大而厚的组织块置于显微镜下观察,必须进行制作切片,才能供显微镜下观察应用。

石蜡(或徒手)切片,是将植物切成薄的材料,按下列主要步骤与要求制成永存切片。



从上述主要环节来看,首先将材料加以处理(1、2、3项),第二步进行制片基础的处理工作(4、5、6、7项),在保证质量完成这两类工作基础上,方可顺利完成切片工作(包括8、9、10项),也就是说切出符合规格的薄片来,然后再对组织进行染色、脱水、透明等

表 1—1 植物制片的类型和方法

类 型	方 法	主 要 内 容
切 片 法	1. 徒手切片法	用刀片或有柄剃刀切片。方法简便, 要求设备简单, 但徒手切片技术要求熟练, 方可切出好的薄片
	2. 石蜡切片法	为教材重点介绍的常用方法。以石蜡作包埋剂, 用旋(回)转切片机切成薄片, 经一系列处理制成永存切片
	3. 滑走切片机切片法	将材料夹持于夹持物(如石蜡、火棉胶、胡萝卜等)中, 并固定于滑走切片机夹物台座上, 进行切片, 此类型切片机可附冰冻装置切片
	4. 半薄切片法	方法步骤与石蜡制片近似, 但包埋剂为塑料或环氧树脂, 采用玻璃刀
	5. 超薄切片法	超薄切片机制作超薄切片, 供电子显微镜观察用, 技术要求更严格
非 切 片 法	1. 离析法	以化学药剂、酶等, 对植物组织进行处理, 使细胞各自分离成单细胞, 常用于木材药材研究
	2. 压片法	经化学药剂处理并用手工机械地使植物细胞分离(呈一团或为分散相)的方法, 如染色体压片法
	3. 整体封藏法	将完整细小的组织块进行处理, 封藏为永存片, 如叶表皮整体制片、团藻、水绵、黑根霉等装片

注: 此类方法, 有时以1—2种配合使用, 以达到研究目的

一系列工作, 才可制成透明清晰、染色鲜艳、适合显微镜观察摄影, 并作教学、科研长期保存的永存片。其详细制片过程与方法, 在以后章节内加以介绍。

通常制片分两大类型(表1—1)。

第二节 溶液的配制

(一) 各级酒精浓度的配制 在植物制片中常用各级酒精, 一般以95%酒精来配制, 为节约起见, 避免用无水酒精来配制各级酒精(表1—2)。

表 1—2 各级酒精浓度的配制

所需配制酒精 的浓度(%)	原有酒精浓度 (%)	原有酒精浓度减去所配制的浓度 = 应加蒸馏水量(ml)	配时应加酒精及水量
30	95	$95 - 30 = 65$	30ml 95% 酒精加65ml 蒸馏水
50	95	$95 - 50 = 45$	50ml 95% 酒精加45ml 蒸馏水
75	95	$95 - 75 = 20$	75ml 95% 酒精加20ml 蒸馏水
85	95	$95 - 85 = 10$	85ml 95% 酒精加10ml 蒸馏水

在实验中使用酒精量较大，每次以量筒量液花费时间多，可在500ml细口瓶有玻璃塞的瓶上贴一条宽1cm与瓶等长的白色纸条，仅在第一次用量筒量酒精与蒸馏水的用量处划上刻度，以后每当瓶内溶液用完，即以纸条上刻度分别倒入酒精和蒸馏水的各用量即可。

(二) 低浓度溶液配制 制片中染色液绝大多数为此类溶液。如1%番红水溶液，即为番红1g溶于100ml的蒸馏水中；又如0.5%曙红（伊红）酒精溶液为0.5g曙红溶于100ml的95%酒精中。

其他如重量百分比浓度、摩尔浓度、克当量浓度等溶液的配制，在附录5中介绍。

(三) 药品的规格（表1—3）

表 1—3

规 格	代 号	级 别
实验试剂	L.R	四 级
化 学 纯	C.P	三 级
分析试剂	A.R	二 级
保证试剂	G.R	一 级

注：制片使用药品为化学纯适宜，必要时使用分析试剂，有的还可用实验试剂，为了节约最好不越级使用。

第二章 石蜡法制片原理与方法

第一节 材料的选择与分割

材料的选择和切割是根据研究目的而决定的，应注意以下诸条件。

1. 应选取新鲜、无病虫害并具代表性的材料。
2. 先作徒手切片或剥离检查，决定适宜的材料立即固定处理。
3. 注意按季节及植物生长发育的不同阶段而选取材料。

4. 材料大小要适当，如根的直径在5mm以内的，可切取5—10mm长的小段，直径在5mm以上者可纵分割成1/2或1/4，横切厚度约3—5mm；若以滑走切片机切片，长度约在2—3.5cm〔图2—1（A、B）〕。

叶的切取按图2—1（C）切成2—5mm，若叶较宽可切10mm的长条，叶面切取的部位，以研究者的目的灵活选取。切取材料必须使用新刀片，刀口和叶面垂直迅速切割下来。

花、果的切割：花药和雌蕊切割，按图2—1（D），花芽和幼穗的切割，须剥去外部鳞片及叶鞘和其他部分，切去多余部分再入固定液；有的花序则需去掉外方苞片，一般小的花不经切割可投入固定液，大花果才进行分割处理。

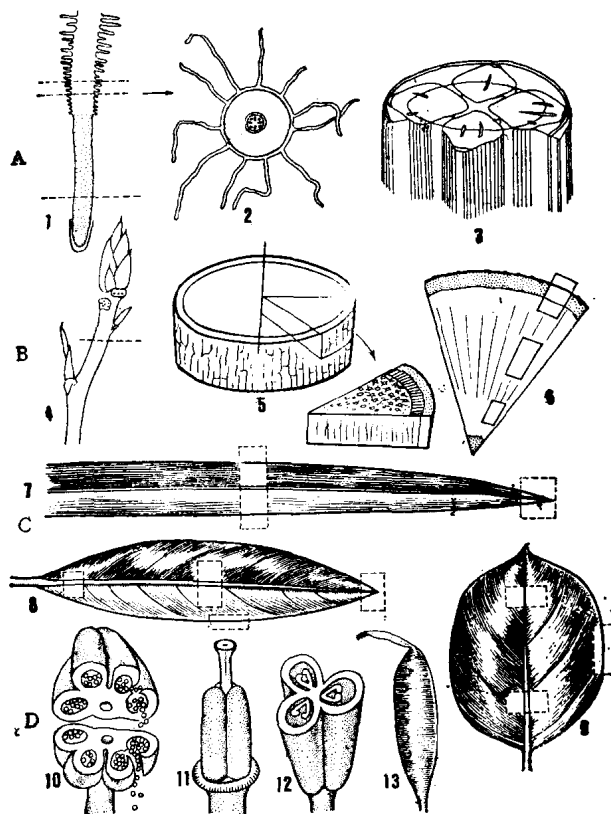


图 2-1 器官切取部位图

A、B. 茎的切取 (1—6) C. 叶的切取 (8—9) D. 花的切取 (10—13)

第二节 杀生、固定及保存

一、杀生、固定及保存的概念

杀生 (杀死): 在制片过程中, 将拟制片的材料 (细胞或组织块) 迅速杀死, 使组织块尽量保持原生活时状态, 这种处理通称杀生。杀生时常用一种或多种化学药品处理。一般以渗透力较强的药剂作杀生剂效果较好。

固定: 在杀生处理的过程中, 将器官、组织、细胞按原来的形态保存下来, 并为后续制片保持固有形态, 这样才达到固定的要求。杀生与固定关系密切, 通常二者兼有作用。

保存: 组织块经杀生固定后, 能较长时间保存下来, 经久保存下来的组织块, 仍能制片, 如酒精、醋酸、福尔马林液保存时间较长, 而铬酸类固定液, 常须转换70%酒精液后保存, 才可较长时间保存。

每种杀生与固定液都有其优缺点。有些杀生剂透入迅速, 有些透入较慢, 又有些透入虽快而会损害组织, 为此人们在实践中常加其他药剂调节, 或用水冲洗等, 以弥补其不足。

301852

在材料开始处理脱水前，需将组织块中含固定液冲洗掉，以便后续处理顺利进行。通常冲洗法如下：

1. 流水冲洗法（图2—2） 将医药用塑料小瓶，用烧红（酒精灯）了的解剖针，刺成无数小孔（孔的大小，由材料的大小决定），或剪去眼药瓶（塑料）的底部，焊上尼龙纱（图2—3）。冲洗前将材料倒入制成的滤器内，固定液漏下丢弃，加另一塑料盖，置广口瓶或培养缸内，以流水冲洗（自来水龙头上套一个连接头，也是用塑料眼药瓶剪去底部，再反装水龙头上，眼药瓶细嘴的一端，连接一个橡皮管，后将橡皮管通入装材料的瓶中，让流水徐徐从瓶底向上冲洗材料）。

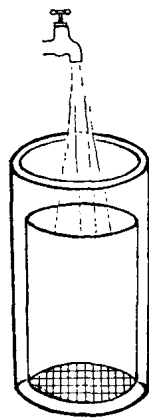


图 2—2 流水冲洗法

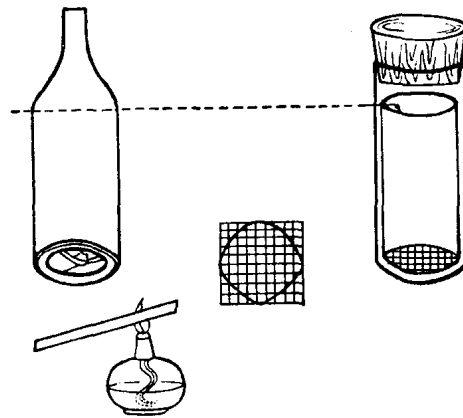


图 2—3 塑料滤网焊制法

2. 静水洗涤法（图2—4） 如以酒精洗涤，或不能使用流水冲的材料（根尖、花药等）则用连续换洗来达到清洗目的，每次换液只需提起滤器，倾去旧液，换进新液。这种洗涤法的优点是：①不会损坏组织材料；②省时间省药品，提高工效和经济效益。凡经水至各级酒精脱水至70%酒精级时，材料可保存备用。

固定时，往往采用杀生与固定同时作用的混合固定液，其中药品常具平衡作用，如甲种药剂使细胞皱缩，加乙种药剂使其细胞膨胀，这种平衡固定液才宜使用，若两者对组织都不利，则一定不可采用；另对易氧化的药物不要与其他物质混合，因其还原力强，常使固定液发生变化而影响材料的固定，固定前材料存放器皿要根据材料大小性质进行选用（图2—5）。

此外，还要注意以下有关问题。

1. 要注意固定目的物本身的结构性质，以便选用适合的固定液，如一般根、茎、叶的组织切片用FAA，根尖、花药压片材料用卡诺氏固定液，花药胚囊用纳瓦申（Navashin's）液，茎尖（根尖）用铬酸-醋酸液。另外，固定时间的长短，要根据材料的特点而增减。

2. 固定微小材料可直接投入固定液中，对于较大材料，则须将其先解剖成较小材料，

423104

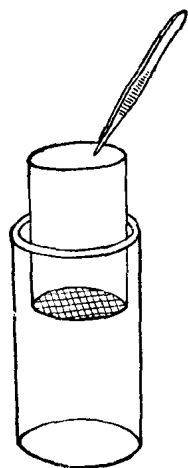


图 2—4 静水洗涤法

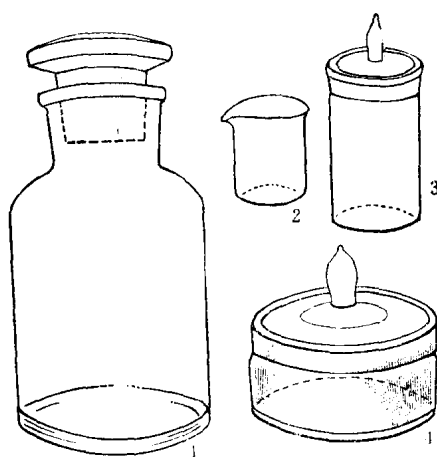


图 2—5 常用固定材料的器具

1. 广口瓶(30ml) 2. 微形烧杯 3. 称量瓶 4. 称量瓶

迅速投入固定液，以完成杀生固定作用。

3. 当体积较大的材料，出现外部已超过固定作用，而内部仍未达到固定目的时，必须考虑用透入快的固定液，如醋酸酒精或苦味酸蚁醛混合液。另外，加用超声波发生器处理数分钟，能达到迅速杀生的目的。

4. 对多毛的芽或根茎（菊科有的芽）固定时，须先投入醋酸酒精液中浸数分钟，然后再入纳瓦申液或其他固定液中，完成其固定作用，与此同时，还须进行抽气（装置如图2—6）。另可用超声波发生器进行抽气固定。

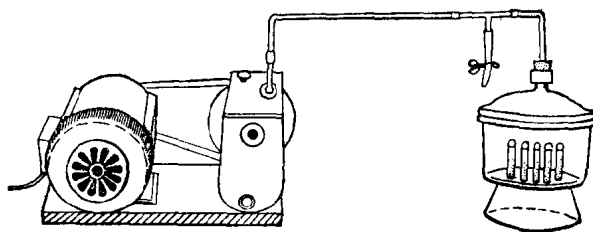


图 2—6 抽气装置

5. 要考虑固定影像问题。一般固定液固定影像有两种类型。酸性固定影像对染色质、细胞核、纺锤丝等能保存，而对细胞质、核质、线粒体则溶解。盐基性固定影像对间期的染色质、纺锤丝溶解，核质、线粒体则保全。

一般固定液多为酸性固定影像，盐基性固定影像较少。影像的形成并不完全按固定液的性质产生。同一种固定液，有时因材料的不同其影像有差异，因此，除考虑影像外，还应在脱水剂、渗入剂方面进行观察，适当选择，如同一种材料，用纯酒精与二甲苯脱水透明和用三丁醇脱水透明，两者所产生的影像是不相同的。

6. 固定剂的浓度，也是不可忽视的条件。

7. 材料的标记。固定标本瓶上，必须贴以标签，用碳素墨水书写以下内容：编号、采集时间、地点、处理者的姓名简写。另外，还需记采用何种固定液、何种保存液等内容。