

植物生物学实验

李玉平 主编



-33

西北农林科技大学出版社

Laboratory Manual for Plant Biology

植物生物学实验

主 编 李玉平

编 者	陈铁山	姜在民	苗 芳
	慕小倩	崔宏安	郝文芳
	李 琰	蒋选利	易 华
	曹翠兰	杨文权	张宏昌
	李玉平		

西北农林科技大学出版社

内 容 提 要

本书是为适应现代植物科学的发展以及新编《植物生物学》的课程体系而设计的配套实验教材。全书包括植物生物学常用实验技术及原理、植物体的形态与结构、植物的生长与发育、植物多样性与分类、植物与环境、植物生物学野外实习以及附录等 7 部分,共设计了 30 个实验。其目的在于给学生提供植物生物学理论与实践相结合的平台,以便使他们熟悉植物生物学以及与之相关的实验技术和研究方法,并牢固掌握植物生物学知识。

本书是集完整性、系统性和可操作性于一体的实验教材,可满足开设植物生物学实验的各类大专院校的教学需要,同时也可供从事生物学及相关领域的工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

植物生物学实验/李玉平主编. —杨凌:西北农林科技大学出版社,2003. 10
ISBN 7—81092—018—9

I. 植… II. 李… III. 植物学-实验-高等学校-教材 IV. Q94-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 089629 号

植物生物学实验

主编 李玉平

西北农林科技大学出版社出版发行

(陕西杨凌杨武路 3 号 邮编:712100 电话:029—7093302)

传 真:029—7093105

电子邮箱:press0809@163.com

西北农林科技大学印刷厂印刷

2003 年 10 月第 1 版第 1 次印刷

开本:787×1092 1/16 印张:12.75

字数:294 千字

ISBN7—81092—018—9/Q·3

定价:15.80 元

本书如有印装质量问题,请与本社联系

前 言

21 世纪初植物科学发展的趋势将突出地表现在以下 3 个方面：(1)以分子生物学为代表的微观领域和以生态学与生物多样性研究为代表的宏观领域将更加深入迅速地发展，二者将进一步相互渗透与融合。(2)植物科学的各个分支学科间以及其他学科间相互渗透，学科间的界限逐渐淡化。(3)植物科学的研究将会更加密切地与解决人类面临的粮食、能源、环境、生物多样性保护等重大实际问题紧密联系在一起。在这种形势下，国内学者周云龙，王凯基，杨继等人先后编写了几种版本的《植物生物学》教材。这些《植物生物学》教材的特点在内容和体系的编排上突破了传统植物学教材的“老二册”(形态解剖与系统分类)和植物学与植物生理学分离的框架。新编《植物生物学》教材涵盖了植物学、植物生理学两门课的主要内容，还增加了植物与环境、植物的多样性、植物资源、植物进化及植物科学领域中的新知识、新进展等。全书贯穿着植物从低级到高级，从简单到复杂，从水生到陆生等系统进化的思想。这一内容体系既体现了植物形态结构与功能的有机的统一，也体现了现代植物学科各分支学科间的相互交叉渗透和融合的发展趋势，同时既重视基础知识和基本理论，又重视知识更新，反映了现代植物科学的主要新成就和新进展。总之，新编《植物生物学》教材体现了现代植物科学的发展方向，适应了 21 世纪的教学改革要求，集科学性、时代性、信息性、启发性和适用性为一体。本书正是为适应新编《植物生物学》的课程体系而设计，相互配套以促进植物生物学的教学与发展。

本书共编写了 7 部分：植物生物学常用实验技术及原理、植物体的形态与结构、植物的生长与发育、植物多样性与分类、植物与环境、植物生物学野外实习以及附录。其中在植物生物学常用实验技术及原理中介绍了生物显微镜及其使用方法、植物组织制片技术、植物实验材料的采集、培养和保存方法以及植物组织培养的基本技术，有助于学生了解掌握植物科学相关的实验技术和研究方法，并为学生独立开展植物生物科学研究提供参考。植物体的形态与结构、植物的生长与发育、植物多样性与分类、植物与环境以及植物生物学野外实习等，主要是为学生提供了植物生物学理论与实践相结合的平台，学生获得植物科学的综合知识，并且树立起植物形态、结构与机能的辩证统一，植物的生长发育与其内部的生理和基因的调控及外环境的辩证统一，植物个体发育与系统发育的统一的思想和思维方式。这种作用对学生的科学思维发展具有深远的影响和积极的意义，特别对于学生今后从事研究工作意义甚大。同时也有助于使学生领悟 21 世纪植物科学的分支学科间将会更进一步地交叉渗透，各分支学科间的差异和界限逐渐淡化的发展趋势。在附录中介绍了植物生物学实验须知，植物生物学实验中常用的缓冲液、固定液、染液以及植物组织常用的几种基本培养基的配置，植物生物学科学绘图的基本方法，以及结合我校植物生物学实验和实习特点编写了常见种子植物分科检索表以及关中地区常见种子植物名录。

本实验教材共安排了 30 个实验，每个实验计划 2 学时。使用本书时可根据具体情况的不同的而予以选择。该书植物生物学实验技术及原理中的 1-1 由苗芳编写，1-2 由慕小

倩和苗芳编写,1-3、1-4 由李玉平编写;植物体的形态与结构中的 2-1、2-2、2-3 由杨文权编写,2-4、2-5、2-6、2-7 由姜在民编写,2-8、2-9、2-10 由李琰编写;植物的生长与发育中的 3-1、3-2、3-3、3-4、3-5 由郝文芳编写,3-6、3-7、3-8、3-9、3-10 由蒋选利编写;植物多样性与分类中的 4-1、4-2 由张宏昌编写,4-3、4-4、4-5、4-6、4-7 由陈铁山编写;植物与环境中的 5-1、5-2、5-3 由易华编写;植物生物学野外实习中的 6-1、6-2、6-3 由崔宏安编写;附录中的 7-1、7-2、7-3 由曹翠兰编写;7-4、7-5 由李玉平编写;7-6、7-7 由崔宏安编写。全书由李玉平统稿。本书是西北农林科技大学生命科学学院植物教研组教师多年来的教学和科研实践的结晶,在本书的编写过程中得到了西北农林科技大学、生命科学学院领导的关心,教材中心对本书的编写和出版给予了大力支持,我们在此一并表示感谢。本书很多材料和图片引自国内外已出版的植物生物学和植物学教材及其他相关资料,恕不能在此一一致谢。

由于时间和水平的限制,本书难免存在不当与错误之处,恳请同行专家及读者批评指正。

编 者

2003 年 8 月于西北农林科技大学

目 录

1	植物生物学常用实验技术及原理	(1)
1-1	生物显微镜	(1)
1-2	植物组织制片技术	(7)
1-3	植物实验材料的采集、培养和保存方法	(17)
1-4	植物组织培养的基本技术	(32)
2	植物体的形态与结构	(37)
2-1	植物细胞的基本形态与结构	(37)
2-2	植物细胞的后含物及有丝分裂	(40)
2-3	植物组织	(43)
2-4	种子结构与幼苗类型	(47)
2-5	根的形态结构与发育	(50)
2-6	茎的形态结构与发育	(56)
2-7	叶的形态结构与发育	(63)
2-8	花的组成与花序	(70)
2-9	花的发育与果实的形成	(78)
2-10	果实的形态与类型	(84)
3	植物的生长与发育	(88)
3-1	植物组织水势的测定	(88)
3-2	植物灰分常量元素分析	(90)
3-3	叶绿体色素的提取、分离及其理化性质	(92)
3-4	叶绿体色素含量的测定——分光光度法	(95)
3-5	小筐子法测定植物呼吸速率	(97)
3-6	植物内源激素的提取、分离和纯化方法	(99)
3-7	IAA 的生物鉴定——芽鞘伸长法	(101)
3-8	根系活力的测定	(103)
3-9	植物种子活力的鉴定	(105)
3-10	春化作用和光周期处理对植物开花的诱导	(107)
4	植物多样性与分类	(109)
4-1	藻类、菌类和地衣植物的观察	(109)
4-2	苔藓、蕨类和裸子植物的观察	(113)
4-3	被子植物分科(1)	(117)
4-4	被子植物分科(2)	(121)
4-5	被子植物分科(3)	(125)

4 - 6	被子植物分科(4)	(131)
4 - 7	被子植物分科(5)	(136)
5	植物与环境	(142)
5 - 1	植物群落的观察和样方法	(142)
5 - 2	植物与微生物的关系	(147)
5 - 3	环境因子对植物群落作用的分析	(149)
6	植物生物学野外实习	(151)
6 - 1	野外调查的准备工作	(151)
6 - 2	野外调查工作	(153)
6 - 3	植物标本的鉴定和工具书的使用	(155)
7	附录	(158)
7 - 1	植物生物学实验须知	(158)
7 - 2	植物生物学实验常用缓冲液的配制	(159)
7 - 3	植物材料的常用固定液和染液的配制	(161)
7 - 4	植物组织培养常用的几种基本培养基配方	(163)
7 - 5	植物生物学科学绘图的基本方法	(164)
7 - 6	常见种子植物分科检索表	(166)
7 - 7	关中地区常见种子植物名录	(179)
主要参考文献		(198)

1 植物生物学常用实验技术及原理

1 - 1 生物显微镜

显微镜(microscope)是生命科学与科研工作的重要工具之一。一般分为光学显微镜和电子显微镜两大类。光学显微镜又可分为单式显微镜和复式显微镜。单式显微镜结构简单,常用的如放大镜,由一个透镜组成,放大倍数在 10 倍以下。构造稍复杂的单式显微镜为解剖显微镜,也称为实体(entity)显微镜,是由几个透镜(len)组成的,其放大倍数在 200 倍以下。放大镜和解剖显微镜放大的物像都是与实物方向一致的虚像(virtual image),即直立的虚像。复式显微镜结构比较复杂,至少由两组以上的透镜组成,放大倍数较高,是植物形态解剖实验最常用的显微镜。其有效放大倍数可达 1 250 倍,最高分辨力为 $0.2\ \mu\text{m}$ 。复式显微镜是研究植物细胞结构、组织特征和器官构造的重要的和不可取代的工具。复式显微镜的种类很多,除了一般用的明视野显微镜外,还包括研究用的暗视野显微镜、相差显微镜和荧光显微镜等。因此,每个学生都必须很好地学习复式显微镜的构造、使用方法和维护保养方法,较熟练地掌握正确的显微镜操作技术。

【生物显微镜及其使用方法】

1. 复式显微镜的构造

复式显微镜有单筒目镜和双筒目镜两种类型。这两种显微镜基本构造相同,都包括两大部分,即光学系统部分和用以装置光学系统的机械部分(图 1-1-1)。

(1) 机械部分

- ① 镜座:显微镜的底座,支持整个镜体,使显微镜放置平稳。
- ② 镜柱:镜座上面直立的短柱,支持镜体上的各部分。
- ③ 镜臂:弯曲如臂,下连镜柱,上连目镜筒,是取、放显微镜时手握的部位。
- ④ 镜筒:是显微镜上部圆形中空的长筒,其上端放置目镜,下端与物镜转换器相连,并使目镜和物镜的配合保持一定的距离,一般是 160 mm,有的是 170 mm。镜筒的作用是保护成像的光路与亮度。
- ⑤ 物镜转换器:是接于镜筒下端的圆盘,可自由转动。盘上有 3~4 个螺旋圆孔,为安装物镜的部位。当旋转物镜转换器时,物镜即可固定在使用的位置上,保证物镜与目镜的光线合轴。
- ⑥ 载物台:是放置玻片标本的平台,中央有一圆孔,以通过光线。在载物台上装有玻

片推动器,当玻片用玻片夹固定好以后,调节移动旋钮,玻片能向前后左右移动。

⑦ 调焦装置:为了得到清晰的物像,必须调节物镜与标本之间的距离,使其与物镜的工作距离相等,这种操作称为调焦。调节物镜和标本距离的装置称调焦装置。调焦装置位于镜柱两侧,有两对齿轮,大的一对叫粗调节器,转动时可使载物台上下升降,转动一圈可以升降 10 mm。小的一对为细调节器,旋转一圈可使载物台升降 0.1 mm。

⑧ 聚光器调节螺旋:在镜柱的左侧或右侧,旋转它可使聚光器上、下移动,借以调节光线。

(2) 光学部分

光学部分由成像系统和照明系统两部分组成。成像系统包括物镜和目镜,照明系统包括反光镜或电光源和聚光器。显微镜的总放大率是由目镜和物镜原有放大倍数的乘积来表示的,如果目镜放大率为 $10\times$,物镜放大率为 $40\times$,那么显微镜的总放大率为: $10\times 40 = 400$ 倍。如果目镜的放大倍数过大,得到的放大虚像则很不清晰,所以一般目镜不宜过大。被检物体细微结

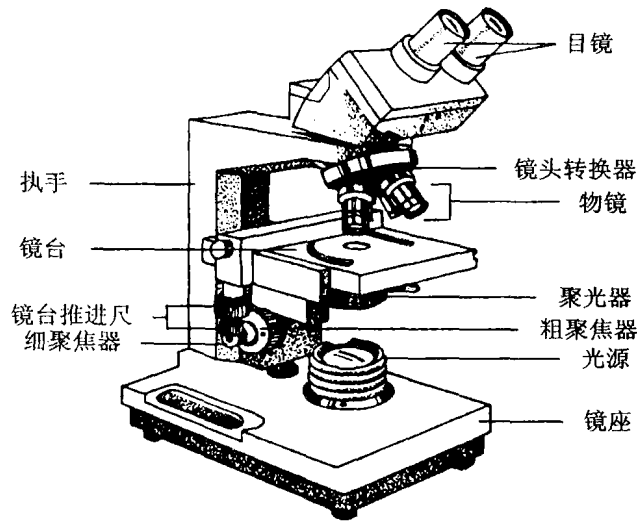


图 1-1-1 普通光学显微镜的结构(仿杨继)

构的分辨力并不完全取决于放大倍数,而主要是由镜口率决定的。在物镜镜头上常标有 N. A 10/0.25, N. A 40/0.65, N. A 100/1.25(油镜头)。N. A 表示镜口率,也就是数值孔径。N. A 的值越大,分辨能力越高。因此,镜口率越大,物镜的价值也就越大,它是衡量显微镜质量的最主要的依据。欲使显微镜发挥它的能力,除有高级的物镜外,还必须有优良的聚光器,因为物镜的分辨力受聚光器镜口率的影响。注意使用时调节至使二者镜口率相等。

① 物镜:是决定显微镜质量的最重要的部件,安装在镜筒下端的物镜转换器上,一般有 4 个放大倍数不同的物镜,即低倍物镜($4\times$ 、 $10\times$)、高倍物镜($40\times$)和油浸物镜($100\times$),使用显微镜时可根据需要选择。物镜的放大倍数一般在物镜镜头上注明,同时还标有数值孔径,物镜可将被检物体作第一次放大。

显微镜的工作距离是指物镜最下面透镜的表面与载玻片(厚度为 0.17~0.18 mm)上表面之间的距离。物镜的放大倍数愈高,它的工作距离愈小(表 1-1-1)。一般油浸物镜的工作距离仅为 0.2 mm,所以使用时要倍加注意。

② 目镜:安装在镜筒上端,也叫接目镜,通常由两个透镜组成,上面的透镜与眼接触叫接目镜,下面一个靠近视野叫会聚透镜或视野透镜。目镜的作用是将物镜所成的像进一步放大。常用的目镜有 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $16\times$ 等,目镜的放大倍数一般在目镜镜头上注明。

③ 反光镜(反射镜):反光镜有两面,一面为平面镜,反光较弱,一般当室内光线较强

时,可使用平面镜;另一面为凹面镜,能会聚光线,通常光线较弱时使用。反光镜具有能转动的关节,可作各种方向的翻转,面向光源,能将光线反射在聚光器上。有的显微镜在底座上安装反射镜的位置安装电光源,电光源是 6 伏 10 瓦的卤钨灯。

表 1-1-1 不同放大率物镜的数值孔径和工作距离

物镜放大率	10×	20×	40×	100×
数值孔径(N. A)	0.25	0.50	0.65	1.25
工作距离(mm)	6.5	2.0	0.6	0.2

④ 聚光器(或聚光镜):聚光器装在载物台下,由聚光镜(几个凸透镜)和虹彩光圈(可变光栏)等组成,它可将平行的光线汇集成束,集中在一点,以增强被检物体的照明。聚光器可以上下调节,如用高倍镜时,视野范围小,则需上升聚光器,用低倍镜时,视野范围大,可下降聚光器。

⑤ 虹彩光圈:装在聚光器内,位于载物台下方,拨动操作杆,可使光圈扩大或缩小,借以调节通光量。

2. 显微镜的基本使用方法

(1) 取镜和放置

按固定编号从镜盒中取出显微镜。取镜时应右手握住镜臂,左手平托镜座,保持镜体直立,防止目镜从镜筒中滑出。放置显微镜时,动作要轻,一般应放在座位的左侧,距桌边约 5~6 cm 处,以便观察和防止显微镜掉落。

(2) 对光

使用自然光或日光灯照明时需要调节反光镜,对光时,先把低倍物镜转到中央,对准载物台上的通光孔,然后用左眼或双眼从目镜向下注视,同时用手转动反光镜,使镜面向着光源。一般用平面镜即可,光弱时可用凹面镜。当光线从反光镜表面向上反射入镜筒时,在镜筒内就可以看到一个圆形的明亮的视野。使用电光源时应接通电源,打开开关,调整电位器手柄,使光亮合适并充满整个视场。此时再利用聚光镜或虹彩光圈调节光的强度,使视野内的光线既均匀明亮又不刺眼。

(3) 双目镜筒间距的调节

用双筒目镜观察时,有时会看到重像,有时只能用一个目镜观察,这是由于双筒目镜镜间距与观察者的瞳孔距不一致造成的。调节双目镜筒间距时,用 10×物镜观察,双眼注视目镜,同时水平方向向外拉动目镜筒,使两目镜的中心距离与观察者的瞳孔距离一致,此时两个圆形视野合二为一。

(4) 低倍镜的使用

观察任何标本,都必须先用低倍镜,因为低倍镜的视野范围大,容易发现目标和确定要观察的部位。使用低倍镜的操作步骤是先将玻片标本放于载物台上,并用弹簧夹固定(将玻片夹在弹簧夹之间),旋转玻片推动器前后和左右移动旋钮,使玻片标本正对通光孔的中心。再将低倍物镜(10×)旋转到中央,小心地向上旋转粗调节器,使物镜离玻片约 1 cm 左右,然后通过目镜一边观察标本,一边旋转粗调节器,使载物台慢慢向上移动,直至

看到物像为止,这时,进一步用细调节器上下转动,使物像达到最清晰的程度。焦点调好后,可根据需要移动玻片,把要观察的部分移到视野正中心。找到物像后,还可根据材料的厚薄、颜色、成像的反差强弱是否合适等再进行调节,如果视野太亮,可降低聚光器或缩小虹彩光圈或降低电压,反之则升高聚光器或开大光圈或升高电压。

(5) 高倍物镜的使用

在观察较小的物体或细微结构时可使用高倍物镜(40×)。由于高倍物镜只能把低倍镜视野中心的一小部分加以放大,因此,使用高倍镜前,应先在低倍镜中选好目标,将其移至视野的中央,转动物镜转换器,把低倍物镜移开,小心地换上高倍物镜。在正常情况下,当换上高倍物镜之后,在视野中即可见到模糊的物像,只要略微调动细调焦螺旋,就可获得最清晰的物像。在换用高倍镜观察时,视野变小变暗,所以要重新调节视野的亮度,此时可升高聚光器或放大虹彩光圈或升高电压。

(6) 油镜的使用

在油浸物镜使用前,也必须先从低倍镜中找到被检部分后,再换高倍物镜调正焦点,并将被检部分移到视野中心,然后再换用油浸镜头。在使用油镜头前,一定要在盖玻片上滴加一滴香柏油(镜油),然后才能使用。当聚光器镜口率在1.0以上时,还要在聚光器上面滴加一滴香柏油(油滴位于载玻片与聚光器之间),以便使油镜发挥应有的作用。

在用油镜观察标本时,绝对不许使用粗调焦螺旋,只能用细调焦螺旋调节焦点。如盖玻片过厚,则不能聚焦,应注意调换,否则就会压碎玻片或损伤镜头。

油镜使用完毕,需立即擦净。擦拭方法是用棉棒或擦镜纸蘸少许清洁剂(乙醚和无水酒精的混合液,最好不用二甲苯,以免二甲苯浸入镜头后,使树胶溶化,透镜松解),将镜头上残留的油迹擦去。否则香柏油干燥后,就不易擦净,且易损坏镜头。

(7) 显微镜使用后的整理

观察结束后,调节电压调节杆到最小值,然后关掉电源开关。旋转粗调焦螺旋,使载物台下降到最低位置,取下玻片,擦干净镜体,罩上防尘罩。然后用右手握住镜臂,左手平托显微镜底座,按号收回镜箱中。

3. 显微镜测微尺的使用

显微镜测微尺能正确地量出显微镜内所观察物体的大小,通常包括两个部分,一个是镜台测微尺,另一个是接目测微尺,两者配合使用测量被观察物体的长度和面积。

(1) 镜台测微尺

是一块长方形的载玻片,在中央部分有一具等分线的圆形盖玻片,上面的等分线长为1 mm,被分成100个小格,每小格长0.01 mm。

(2) 目镜测微尺

是放在目镜内的一种标尺,为一块圆形的玻璃片,直径20~21 mm,正好能放入目镜内,上面刻有不同形式的标尺。有直线式和网格式两种,用于测量长度的一般为直线式,共长10 mm,也被分成100个小格,网格式的测微尺可以用来计算数目和测量面积。

(3) 长度测量法

测量长度时,通常以目镜测微尺和镜台测微尺配合使用,先将目镜测微尺的圆玻片放入目镜中部的铁圈上,观察时即可见标尺上的刻度,但其每一个小格的长度不是固定不变

的,而是随着物镜放大倍数的变化而变化,所以不能直接用它来测量长度,必须先用镜台测微尺确定它每一小格的值。具体方法是:先将镜台测微尺放在载物台上,如观察普通标本一样,调节焦距,使标尺上的刻度观察清楚后,即可移动镜台测微尺,使镜台测微尺与目镜测微尺的刻度重合(图 1-1-2),选取成整数重合的一段,记录两者的格数,然后计算目镜测微尺每格的长度。如果目镜测微尺的 40 格等于镜台测微尺的 55 格,那么在当前的放大倍数下目镜测微尺每格代表的长度为:目镜测微尺每格的长度/ μm = $55 \times 10 / 40 = 13.75$ 。这时,就可将镜台测微尺移去,换上待测量的标本,如果用目镜测微尺测得细胞的长度为 10 个格,那么细胞的实际长度为 $13.75 \times 10 = 137.5 \mu\text{m}$ 。

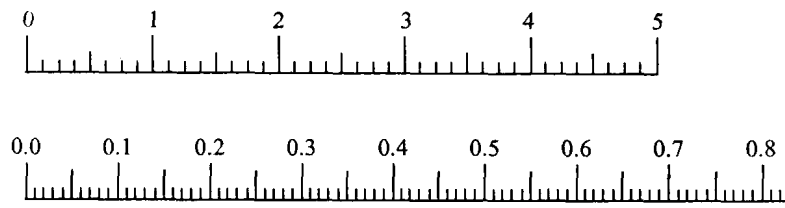


图 1-1-2 目镜测微尺的标定(仿林加涵)

上方的标尺为目镜测微尺,下方为镜台测微尺,目镜测微尺的 40 格与镜台测微尺的 55 格重合。

$$\text{目镜测微尺每格的值} = \frac{\text{镜台测微尺的格数} \times 10 \mu\text{m}}{\text{目镜测微尺的格数}}$$

4. 体视显微镜的构造和使用方法

体视显微镜的机械部分由底盘、载物台、镜柱、镜臂、调焦手轮和物镜变倍手轮等组成,光学系统由变倍物镜、半五角棱镜、直角棱镜和目镜组成。被观察物体经变倍物镜第一次放大后,成像于视场光栏处,再由目镜作第二次放大,半五角棱镜可使光轴偏转 45° (便于观察),直角棱镜则使物像正转,使目镜焦平面上观察到与物体方位一致的正像,这有利于在解剖镜下的实际操作。直角棱镜组可转动,以便调节瞳间距离,变焦系统为机械补偿式结构,通过物镜变倍手轮旋转,可选择物镜的放大倍率,并能获得稳定的像面。

体视显微镜的操作步骤如下:

- (1) 接通电源,根据使用者需要可选择透射或反射照明系统。
- (2) 将被观察物体放在载物台中心位置,并用片夹压稳。
- (3) 扳动左右目镜筒,使之与使用者双眼瞳距一致,便于观察。把物镜调节到最低倍率($0.7\times$),然后慢慢转动调焦手轮,先使右目镜能看到清晰的物像,再调节左目镜视度圈,使左目镜得到与右目镜同样清晰的物像。
- (4) 根据使用者的需要,可通过变倍调节手轮调节放大倍率。

5. 使用显微镜时的注意事项

显微镜是一种结构很精密的仪器,在使用时必须十分小心,注意事项如下:

- (1) 使用显微镜时必须严格按照操作规程进行。
- (2) 使用显微镜时应轻取轻放,防止震动造成光学系统光轴的偏斜而影响观察。
- (3) 使用显微镜时不得自行拆开光学零件,不要把目镜从抽管中取出,否则会使灰尘

落入镜筒内,不易清除。如果必须将目镜取出时,应立即用布或其他物品把它盖好。

(4) 用高倍物镜观察标本时,必须先用低倍物镜观察,调节焦距,观察到清楚的像后,再换高倍物镜,慢慢调节细调节器,直至像清楚为止。高倍物镜的工作距离较小,操作时要非常小心,以防压碎切片。

(5) 油浸物镜一定要在盖玻片上滴油后才能使用,用毕应立即将油擦干净。方法是用擦镜纸蘸清洁剂(乙醚与无水乙醇的混合液)少许,将镜头上残留的油渍擦净,否则干后就不易擦去,而损伤镜头。

(6) 为了保持显微镜各部分的功能,必须尽量避免潮湿和灰尘,否则就会影响镜头和各个活动部分的使用。因此,须经常备有一块纱布和一块绸布。用纱布拭去金属部分的水分、潮气或灰尘等;绸布用来拂去光学系统的光学玻璃部分的灰尘。在气候潮湿地区,应在显微镜的箱内放氯化钙(CaCl_2),保持干燥、防止镜头发霉, CaCl_2 失效后须立即更换。

(7) 化学试剂很容易污染光学玻璃,使它晦暗变色。有些化学试剂的蒸汽也易氧化镜头。所以须将光学玻璃保护好,避免和化学试剂或药品接触与靠近。在存放之前,必须擦拭干净。物镜的里面不易清洁,可用毛笔拂拭,切不可用手指触及玻璃。镜头外面可用擦镜纸蘸少许乙醚与酒精的混合液擦拭。

1 - 2 植物组织制片技术

植物组织制片技术是随着显微镜的出现而发展起来的,是人们认识植物体结构的有效手段。植物的制片方法很多,我们可根据不同的研究目的和观察对象,选择不同的制片方法,并选择合适的染料(colourant)进行染色,最终获得具有较好的观察效果的制片。

现简要介绍在植物生物学实验中最常用的几种制片方法。

【徒手切片法】

徒手切片法是指手拿刀片把植物新鲜材料切成薄片,所作的切片通常不经染色或经简单的染色后,制成临时的切片用于临时观察,亦可以通过脱水与染色制成永久制片。徒手切片的优点是简单、方便,不需要复杂的设备,不经过化学药物的处理,基本上保留了植物活体的状态。

1. 实验用品与材料的准备

(1) 实验用品

显微镜、载玻片、盖玻片、双面刀片、毛笔、培养皿、滤纸和滴管。

(2) 实验材料

对于软硬适中、便于手持的材料,可将实验材料截成适当小块,一般以长 2~3 cm,切片断面不超过 3~5 mm² 为宜。而对于过于柔软的器官,可选用胡萝卜根、土豆块茎或塑料泡沫作为夹持物,夹住材料后再进行切片。有些叶片可以卷成圆筒再进行切片。

2. 操作过程

在小培养皿中放入清水。用左手大拇指、食指和中指拿住材料,拇指略低于食指与中指,并使材料略微突出在指尖上面,这样可以避免伤到手。右手持刀,将刀片平稳的放在左手食指之上,与材料切面平行。然后以均匀的动作,自左前方向右后方,斜着向后拉切,切时用臂力而不用腕力。如此循环多次,切下许多薄片后,用湿毛笔将这些薄片放入培养皿中。用毛笔挑选透明的薄片,放在载玻片上,用吸管滴一滴水在载玻片上,盖上盖玻片,制成临时装片进行观察。

注意在切片前,要不断地用水湿润材料和刀片。切片时,两只手应该保持活动状态,不要使它们紧靠身体或实验台,且用力不要过猛,不能用刀片挤压材料或来回切割材料。动作要敏捷,材料要一次切下,不要追求切片形状的完整。

3. 组织化学染色

(1) 简单的组织化学染色

经徒手切片法切下的薄片,可以进行简单的组织化学染色,这样更容易分辨细胞的结构,同时可以观察到细胞各部分的化学成分。

① 1% 番红水溶液:木质化、栓质化的细胞壁及细胞核红色。

② 25% 硫堇(亦称劳氏青莲或劳氏紫)水溶液:组织呈现从粉红色到蓝紫色的多色

反应,区分含纤维素、木质素的细胞壁。

③ 间苯三酚反应:木质化的细胞壁成红色,颜色深浅与木质化程度有关。

④ I_2 -KI 染色:淀粉粒呈蓝色,细胞核呈黄色。

(2) 徒手切片的固定、染色、透明及封片

① 固定与染色:永久制片时,将检查合格的切片,移入培养皿中,应用滴管分别吸取 50%、70% 的酒精溶液放入培养皿,每级固定脱水 2~3 min(或更长时间),换入 1% 番红的 70% 酒精溶液,染色 5~10 min(或更长时间),用 70% 酒精溶液洗涤两次,经 85%、95% 酒精溶液脱水,每级 2~3 min,用 0.5% 固绿的 95% 酒精溶液染色约 0.5~1 min,用 95% 酒精洗涤两次,使颜色深浅适度,最后进入 100% 酒精 1~2 min,两次。

② 透明与封片:脱水至 100% 酒精时须换干燥的培养皿,以保证脱水完全。换入二甲苯透明约 2~3 min,再将材料轻轻挑起放入清洁干燥的载玻片上,加滴加拿大树胶,盖上盖玻片,烘干。

【涂抹制片法】

涂抹制片是将植物的器官或组织经处理后(例如先染色),把它涂抹或压成一薄层,或不经任何处理压成一薄层的方法。这可以作为临时观察研究的方法,也可以经过一系列脱水、透明手续后制成永久封片。本法对根尖、茎尖、叶原基、花药等材料很适用,尤其是研究细胞学的重要方法(如染色体的计数、核型分析等)。其缺点是制片后组织杂乱,过多地改变了原来的形态结构。

涂抹制片法的一般步骤为:前处理→固定→分离→软化→染色→封片。

1. 前处理

在根尖固定、染色之前,可用秋水仙素处理,因为秋水仙素具专一地抑制纺锤丝形成的作用,分裂中的细胞可以被阻止在中期,并使细胞膨胀,染色体缩短分开,以便观察计数。秋水仙素常用 0.01%~0.1% 浓度,处理 1~4 h。前处理也可以用 8-羟基喹啉代替,其浓度为 0.004%~0.005%,处理 3~4 h。当用秋水仙素进行前处理,假如时间控制不好,染色体会过分缩短,且会出现染色体数目的加倍,必须注意时间不能太长。

2. 固定

经过前处理的材料,一般再经过约 1 h 的短时间固定,主要目的是尽快杀死细胞,尽可能保持原有的结构。通常用的固定液为 95% 的酒精和冰醋酸(3:1)配制而成。如不立即涂片观察的材料,固定 1 h 后,移入 70% 酒精,置于冰箱低温下保存,但一般保存时间不要过长,否则不易涂片和着色。

3. 分离软化

经过固定的材料还需软化,通常用 10% 盐酸或者 95% 酒精和浓盐酸等量混合配制成的溶液,浸泡 20~30 min。目的是破坏细胞间的果胶层,使细胞分离软化,便于涂片。

4. 染色与涂片

将软化过的材料,用清水洗涤后,放在载玻片上,用刀片切下根尖染色深的很小的一点,其余部分去掉,加上地衣红染色剂,染色数分钟后(时间随不同材料而异),盖上洁净的

盖玻片,用手指轻压一下,再用铅笔的平头一端,从中心往边缘轻轻地敲打,用力不能过猛,在此期间,不要移动盖玻片,涂压成均匀的涂片,便可镜检。

5. 永久片的制作

镜检后理想的片子,可以制成永久片子,以便较长时间保存,作为观察研究用。制作过程:准备5套直径约12 cm的培养皿,每套培养皿中放一根短的玻棒,按顺序倒入50%酒精→95%酒精→100%酒精→1/2 纯酒精+1/2 叔丁醇→叔丁醇。将盖玻片向下放入50%酒精的培养皿中,一端搁在玻棒上,使盖玻片自然脱落。然后将盖玻片或载玻片(看材料粘在哪个玻片上)顺序脱水各5~10 min,最后用滤纸吸去多余的叔丁醇,滴上加拿大树胶封片。

【滑走切片法】

滑走切片法是利用滑走切片机切新鲜的或保存的材料,也可以切经由石蜡制片法包埋的材料。此法切出的切片厚薄均匀、结构完整,适用于一些较硬的材料,如木本茎、根、枝条等的切片。

在做滑走切片前须对材料进行软化处理。一般除先用水煮外,用下列两种方法软化:

(1) 甘油—酒精软化法

凡要处理的材料,都应先用抽气机或简易抽气办法除去材料内部的气体,以免妨碍软化剂的渗入。普通也可就用水煮办法,水煮兼有使木材软化的作用,平常木材约煮1~2 h,冷却后再投入甘油—酒精软化剂(此剂配方将1份甘油和1份95%酒精混合而成)中。软化时间视木材的性质不同,自1星期至数星期。检查软化是否合适,可用刀片切割材料如较容易切下薄片,则表示软化已好。

(2) 氢氟酸软化法

预备处理的材料最好也先煮2~3 h,而且要间歇反复进行,或者连续煮沸(注意随时加水)24 h,冷却后放入市售浓度的氢氟酸(约37~40%)与水各半混合液中,特硬的材料须用原液浓度。盛装氢氟酸不能用玻璃或陶瓷器皿,必须用特制蜡质或塑料容器,也可在玻璃器内浸涂一厚层石蜡。软化操作最好在通风橱内进行,一个月左右可以软化完全。要检查是否已软化合适时,必须先用流水充分洗涤后再进行切割,并且要戴上医用橡皮手套,绝不能草率从事。软化好的材料,可放在多孔的小盒中流水冲洗2~3 d。

用滑走切片机切片时,先准备培养皿一个,并装有蒸馏水;毛笔一支,并把要切的材料准备好。切片时先把切片刀固着在固着器上,然后把材料用二片木片夹着,材料露出木片半厘米,再固着于切片机的固着器上。调好材料的高度,使刀刃靠近材料的切面,并使材料与刀刃平行。调整厚度调节器,使所指刻度正适合切片厚度的要求后,便可进行切片。切片时用右手扶切片刀固着器,往自己方向拉,材料便被刀切下而附着于刀的表面上。此时用毛笔蘸水把切片取下放于培养皿中,然后把刀推回,转动厚度推进器后,再拉切片刀。如此来回推拉,便可获得许多厚度均匀的完整切片。如切坚硬的材料可以直接夹在切片机的固着器上。柔软的材料可先夹于胡萝卜或土豆中,再进行切片。

【组织分离制片法】

植物组织分离制片法,是用各种机械或化学药剂等处理,使组织中的细胞彼此分离的制片方法。分离出来的细胞单元,可以在显微镜下观察其长、宽、厚的立体形态结构。

1. 硬组织离析法

(1) 杰弗赖(Jeffrey)离析法(硝酸—铬酸法)

取枝条等硬的组织,用利刀纵削成长约1~2 cm的碎片,投入试管中,加水煮沸数分钟,排出材料中的空气,直至材料沉入试管底部。然后浸泡入杰弗赖浸离液(此液是10%硝酸与10%铬酸等量混合成的浸离液)中,放在35℃温箱中2~3 d。在浸离过程中,浸离液由红黄色渐变为绿色,以至黑绿色,浸离液的作用也渐渐减弱。如果材料仍未松软,可重新换新的浸离液,以加速细胞的离析。离析完毕,倾去浸离液,用水冲洗4~5次,每次5~10 min,将酸类完全冲洗掉,保存于70%酒精中备用。洗涤时,由于材料松软,细胞全离析不易收集,最好用离心机离心。

(2) 舒尔泽(Schultze)法(浓硝酸法)

浓硝酸离析作用很强,适用于极坚硬的材料如木材的离析。具体方法:将坚硬的木材块,先敲成碎块,然后投入盛有浓硝酸(用市售浓硝酸加蒸馏水1份制成)的试管中,材料需完全浸没在硝酸溶液中,再加入少量氯化钾晶体,在酒精灯上微微加热,以至沸腾,直至材料变白为止,倾去浸离液,用清水冲洗4~5次,并随时用玻璃棒搅动。最后保存于70%酒精中。

2. 软组织离析法

(1) 盐酸法

将植物茎段沿纵轴切成若干小片,浸入4份95%酒精及1份盐酸的混合液中1~2 d。经水洗,换4~5次,移入10%氨水10~15 min,再用水洗。为了加速离析,可用玻棒搅动,用解剖针撕分。分离后的材料保存于70%酒精中备用。

(2) 氨水离析法

此法适用于观察分生组织细胞的立体形态结构。将刚发芽的蚕豆、大豆或其他植物的幼根,纵切成薄片,在浓氨水中浸泡24 h,以溶去细胞之间的中胶层,再在10%氢氧化钠的50%酒精溶液中浸24 h,然后用水清洗。最后,用染纤维素的方法染色,使材料出现深蓝色,取少许材料于载玻片上,盖上盖玻片,并用解剖针柄轻敲,使细胞完全分离。在显微镜下可以观察到分生细胞的立体形态。

染色方法:先将1%碘液滴在材料上,再加一滴66.5%硫酸染色,使材料变为深蓝色。

1%碘液的配制:先将1.5 g KI溶于100 mL的蒸馏水,待全溶解后,加入1 g的碘,震荡溶解。

66.5%硫酸溶液的配制:7份浓硫酸加上3份蒸馏水配制而成。配制时将浓硫酸慢慢加入蒸馏水中,并不断用玻棒搅动。