

高等学校教学用书



植物显微化学 实验指导

Л. И. 德日阿帕利捷著

人民教育出版社

高等学校教学用书



植物显微化学实验指导

Л. И. 德日阿帕利捷著
余 名 崧 译
沈阳药学院外语教研室校

人民教育出版社

本书是根据苏联“苏维埃科学”出版社 (Государственное издательство “Советская наука”) 出版的德日阿帕利捷 (Л. И. Дженардзе) 著的“植物显微化学实验指导” (Практикум по микроскопической химии растений) 一书 1958 年版译出的。原书经苏联高等教育部审定为国立大学用教学参考书。

全书包括绪论、物质的显微化学鉴定法、配方三大部分。比较详细地讲述显微化学技术方面的问题，介绍分析和配方的方法。在显微化学鉴定部分，讲述各种物质的分析；在配方部分，介绍了各种试剂共 149 种。另有试剂索引，便于检查使用。

本书可作为综合大学和师范学院生物系师生的参考书，也可供科学研究工作者参考。

本书由我社于 1956 年出版，现将全部译文作了全面的修订，作为修订本出版。

本书原由高等教育出版社出版。自 1960 年 4 月 1 日起，高等教育出版社奉命与人民教育出版社合并，统称“人民教育出版社”。因此本书今后用人民教育出版社名义继续印行。

植物显微化学实验指导

Л. И. 德日阿帕利捷著

余名嵩译

人民教育出版社出版 高等学校教材编辑部
北京宣武门内承恩寺 7 号
(北京市书刊出版业营业许可证出字第 2 号)

商务印书馆 上海厂印刷
新华书店上海发行所发行
各地新华书店经售

统一书号 16010·76 开本 850×1168 1/32 印张 5 4/16 插页 12
字数 126,000 印数 12,001—19,000 定价 (4) 1.00

1956 年 6 月新 1 版 1960 年 6 月第 2 版

1960 年 8 月上海第 5 次印刷

序

不論是教学實驗室或是研究實驗室，研究植物材料時，都極廣泛地應用顯微化學方法。在顯微化學的研究領域中，特別是有关記載在各種植物里發現的物質方面，以及這些物質在植物的組織與細胞中分布的特性方面，我國科學家曾有过寶貴的貢獻。同時，他們革新與改進了許多常用的方法，並且提出許多解決有关國民經濟具體問題的新方法。

遺憾的是，顯微化學各種方法的知識，都分散在一些參考資料和有關論文里，尚未綜合成一部基本參考書。然而，姑且不談多大的全集，甚且只要是一小冊搜集如何應用和做某些反應所需知識的參考書，也是迫切需要的。

我們認為，這本“植物顯微化學實驗指導”是闡述基本知識的簡明手冊，它可以滿足顯微化學工作者的需要。在本“實驗指導”編寫過程中，主要的注意點是放在技術方面——分析方法和配方，而對於顯微化學最廣泛的部分，即植物組織中物質的分布與狀態問題，幾乎完全沒有涉及。

本參考書是編者根據本人研究工作中所做的各種筆記編寫而成。我們在實踐中使用了這本參考書，證明它是適用的，同時亦補充了些我們認為有用的提法和意見。

生物學副博士 Т. А. 喀捷里 (Кезели) 對本書繪制的插图曾給予很大的幫助，並參加了大部分我們進行的顯微化學研究工作。

編者深知，這樣的一本“實驗指導”，並不能滿足我國研究工作多方面探討該學科的要求，這類問題確非編者所能料到。然而，

如果这本书的問世,能引起更多作者写出較完善的、而又为讀者极感需要的参考书,則編者将感到十分滿意。

J. 德日阿帕利捷

目 录

序	vii
緒論	1
显微化学的对象和意义	1
显微化学的特点	2
研究材料的制备	5
制作切片的一般注意事項	7
物質的显微化学鉴定法	10
碳水化合物(糖类)	10
淀粉	10
纖維素	14
糖类(可溶性糖类)	19
蛋白質	27
脂类(脂肪)	31
树脂和揮发油	36
树脂	36
揮发油	38
分泌物	41
橡胶和馬來乳胶	43
色素	46
质体色素	46
叶綠素	47
胡蘿卜素	47
叶黄素	48
細胞液色素	49
花青素	49
花黄素	50
細胞壁	52
纖維素	54

木質素	57
木栓質和角質	63
樹膠	66
粘液	67
果膠質	69
生物硷	70
通論	70
几种生物硷的測定。秋水仙硷	74
咖啡硷	75
毒芹硷	76
阿托品、莨菪硷、东莨菪硷	76
烟硷	77
龙葵硷	78
甙类	78
欧鼠李甙	79
熊果叶甙	80
松柏甙	81
苦杏仁甙	81
甘草甜素	84
鞣质	85
通論	85
均苯三酚鞣质	88
鞣酐	88
无机物质	89
氮(硝酸盐)	89
氮	90
鉄	90
谷胱甘胜	91
醇类(卫矛醇、甘露醇、山梨醇、乙醇)	92
草酸	94
不溶性草酸盐的測定。草酸鈣	95
草酸鎂	96
可溶性草酸盐	97
酶	97
蔗糖酶	98
氧化酶	98

过氧化酶.....	98
过氧化氢酶.....	99
pH 的测定.....	100
菌根.....	102
配方	104
固定剂与保藏剂.....	105
透明剂与浸渍剂.....	107
显微化学试剂与染色剂.....	112
试剂索引	157

緒 論

显微化学的对象和意义

植物显微化学的任务,是测出物质在器官、組織与細胞中的微細含量和确定这些物质的分布状态及所在部位。实际上植物显微化学是一种应用最灵敏方法的定性化学。由于使用了显微鏡,能对外表上为肉眼所看不到的反应进行观察,因而反应的灵敏性大为增加。参加显微化学反应的被檢物质,其重量不以毫克表示,而以微克——百万分之一克(μg 或 γ)表示。

人們对显微化学作用的看法是很不一致的。有的对它评价很高、断然相信它的結論。因此他們忽略了显微化学还是一門比較年青的科学,它的发展有賴于常量化学和許多其他学科的成就,而且显微化学本身仍有很多尚不能闡明的问题,因而絕不能将它估計过高。

另一方面,有的往往对显微化学抱着极其怀疑的态度,认为它是不正确的科学。因此他們忽略了有不少这样的情况,由于机体体积很小,又不可能一下子获得大量的机体,因而常量化学亦是无能为力的。最近,在植物性食品、香料、原料和藥材的研究方面,显微化学的作用日益增长。

显微化学方法在植物分类学的研究领域中,有着重大的意义,因为它指出,植物的亲緣与植物的化学本性是密切联系的。在所謂“系統显微化学”这一科学领域中,有很多研究者采用一系列專門方法,进行研究工作。

从事植物机体的化学研究,最为正确的方法是,兼用常量化学和显微化学的方法。但在有些情况下,常量化学起主要作用(这种情况可能较多);而在另一些情况下,由于条件和要求的特殊性,显微化学则占首要地位。

显微化学的特点

显微化学和研究自然界的任何其他方法一样,亦有其优缺点。透彻了解其优缺点,对每一个把显微化学方法运用到自己工作中的人说来,是完全必要的。如果对显微化学的特点认识不足,就有可能导致曲解所得结果的重大错误。现将其特点综述于下:

灵敏度 显微化学可适用于最微量的被检材料,这点最为重要。显微化学方法可查出显微镜组织切片中一系列不同的物质,而不影响到准确性,这是常量化学所不及的。同时,显微化学反应的灵敏度通常都是非常高的。例如某些元素产生反应时,其极限量是:

钾,以氯化铂沉淀	0.8 γ
镁,以磷酸铵镁沉淀	0.0012 γ
钙,以硫酸盐沉淀	0.04 γ
磷,以磷酸铵镁沉淀	0.008 γ
钨,以氯化钨沉淀	0.1 γ
碘,以碘化淀粉沉淀	0.17 γ

用生物学的方法引起反应,灵敏度还要增高。例如,恩格里曼氏法,即是根据细菌的趋氧性,在一定的光谱范围内测定叶绿体中氧的释出情况。在低等植物生物学中众所周知的许多本能现象(олигодинамическое явление)亦属如此。

工作速度 显微化学的操作与一般化学分析的复杂操作比较起来,它所需的时间要少得多。测定淀粉、纤维素、木质素、脂肪及许多其他物质,真只是几分钟的事情。这样,当有大量材料需要检查时,显微化学的作用便大为提高。大家知道,在进行苏联植物中

的橡胶植物研究时，显微化学曾起过很大的作用。

方法的簡易性 显微化学的方法一般都是极其简单、精巧而且可靠。只在某些个别情况下，显微化学方法才是由许多程序组成的较为复杂的方法。如果我们遇到了一大套测定某化合物的各种反应和方法，其复杂性自然是一种缺陷。这种复杂性往往因方法未改善而引起。显微化学在其发展过程中，淘汰效果小的方法及改进比较合理的方法，从而不断地简化个别复杂的测定法。但是还可以让某些经过检验的、可作为相互对照的反应并存。方法简便及所需设备体积小，遂使显微化学成了最便于野外工作的方法。这种方法的“机动性”，加上操作迅速，而使显微化学成为在野外工作中不可缺少的研究方法。

反应的局部性 能够精确测定被测物质在一定范围内（组织、细胞）所占有的位置，是显微化学的一个特点。我们所以能获得关于植物机体中各种物质分布的详细信息，正是要归功于显微化学方法的这一特点。然而测定时也要估计到，显微化学反应不仅会局部发生，而且也会扩散。在后一情况下，反应中产生的是可溶性物质，它们从生成地点扩散开来，因而，以后可在原先完全没有这些被检物质的组织（或细胞）中看到它们。这种情况是显微化学的缺点之一，遗憾的是往往不能将它消除。例如糖的反应和硝酸盐的二苯胺试验，都属于这类扩散反应。

细胞内含物組成上的复杂性 给显微化学的研究带来很多困难。在细胞结构中含有数以万计彼此有各种联系的不同物质，这种细胞结构上的极端复杂性对细胞内任何化学成分的单独测定都有极大妨碍。经常有这种可能：测定一种物质时，其他物质对反应的进行会有影响，当所有这些物质都在同一个不大的面积内时更是如此。

细胞的死亡 通常，当测定细胞内某种物质时，细胞即被杀

死。所用试剂中，大多数是能毒害并杀死原生质的毒物。由于使用这类试剂，原生质的结构被破坏，物质分布的次序亦被打乱，而以前在空间上被隔离开的那些物质便混杂起来，这样一来，甚至能引起新化合物的形成。因此，必须经常估计到机体死后还可能形成新的物质，这样便不致于把它们误认为是生前即已存在的。墨西哥胜红蓟(*Ageratum mexicanum*)就是一个很好的例子。这种植物在生活状态下连微量的香豆素也没有。但只要稍稍枯萎或受冻，它便死亡，并在体内形成了具有非常强烈的特殊气味的香豆素。正如这种情况一样，有许多颜料和生物硷是植物死后才生成的化合物，决不可认为正常生活组织中就存在有这些物质。

反应的可靠性 反应完全可靠乃是一种理想，可惜显微化学常常不能达到这一理想。显微化学的完全可靠性还是罕见的，通常几种物质能够产生相同的反应。因此有必要进行几种互相对照的反应。例如在研究蛋白质、糖、脂肪、鞣质、树脂和生物硷时，采取这种措施是必要的。每个显微化学工作者应当遵守这个规则：只有在进行了几个互相对照的反应后，才能作出结论。

已知的显微化学反应不够多 还有很多物质现在我们不能研究，这是由于还没有恰当的显微化学反应的缘故。另外，对于许多物质，我们所提出的推论没有足够的根据，也是由于这个缘故。

切片制备上准备工作的影响 上面已经谈过，细胞的死亡是细胞内部相互关系发生改变的一个重大因素，即使细胞仍然保持着生命活动，而材料制备上的一切准备工作（将材料送到实验室、制备切片、洗涤）也会引起重大变化；如渗透性、电位等变化。许多物质的分布和互相关系的变动，都是由于这种结果而产生的，因此，得到的结果就不是生活组织（或细胞）正常状态的反映。

研究材料的制备

供显微化学研究的材料，不仅直接采用有生命的材料或在生活状态下予以固定和凝結的材料（即新鮮材料），而且也常常采用保存（在酒精和福尔馬林中）或干燥的材料（葯材或蜡叶标本）。必須精确地估計到，在哪种情况下可使用哪种材料。

直接研究新鮮材料，应当是没有什么可說的。但是也要注意某些情况。例如，植物的生长期和被研究器官的年齡，对于被研究材料的生物化学状态显然是有影响的。在某些情况下，植物在发芽以前含有大量的甙类，可是在生长期中含量逐渐降低（如丁香素）。此外，也应当考虑到昼夜的时间。叶中碳水化合物含量昼夜发生变动的情形是大家知道的，而其他許多物質也有这种情形。由于只作一次研究可能会得出該植物（器官）不含有某种物質的推断；因此对于含量在变化中的材料必須进行多次的研究。

人們总是将采集的材料保存在水里以保持其新鮮状态，但对此必須慎重。长时期将材料保存在水中，它的化学性质会发生进一步的变化；貯藏的物质会部分地消耗掉（如糖、甙类），其他物質可能分解（如秋水仙硷）因而便不能发现它們。

新鮮材料的固定和凝結，有时候甚至是必要的。一般，研究細胞核时这样处理是必要的；研究易溶的粘液、胶液、原生質、杂色体时，也需要这样处理。固定的方法全視研究目的而定。凝結主要是用普通的酒精，但粘液則用醋酸鉛和醋酸銅来凝結。

材料的保存亦决定于研究的目的。酒精常供保存之用；福尔馬林、苦味酸酒精等則較少使用。酒精保存的材料只能部分地与固定的材料相比拟。因为材料保存时，通常只用70%濃度的酒精溶液，由于材料本身帶有水份以及酒精分子不断地蒸发（如多次揭开材料貯藏罐时），酒精逐渐变淡。此外，这样的酒精不能很快地

渗透到保存材料粗大部分的組織中去，使其充分固定和凝結。純酒精太貴，并能使材料发生較劇烈的皺縮。

溶于酒精的物質，自然会被冲失的；可是許多不为酒精破坏的酶，却仍在酒精保存的材料里繼續作用。在这种情况下，看来可能产生某些条件，使发酵过程特別明显。例如，亚历山大罗夫和契莫費耶夫以及后来亚历山大罗夫和德日阿帕利捷，都曾观察到保存材料中草酸盐的溶解过程，以及淀粉顆粒显然随草酸盐溶解而析出的現象。

同时，水溶性物質（菊糖、磷酸盐和其他无机盐类）也可以在这种情况下析出。叶綠素和其他色素都能被酒精抽出。由于抽出了色素，材料多少有些褪色；但是又因为酶的作用仍在繼續，所以同时亦能发现材料变褐或变黑。只有把剛剛采集的材料放入沸酒精，而后再保存在普通酒精里，才不会进一步变色。

如果用肥皂、皂甙或其他物質减少水的表面張力，則当切片从酒精移入水中时，即可避免由此带来的損害。

酒精蒸气的应用是特別值得推荐的。

在密閉罐的底部注入少許純酒精，或放入酒精浸湿的棉花。将材料用綫悬挂在塞子上，使它不碰到酒精。此法簡化后可改为：取供試材料置于仅在底部盛有少許酒精的密閉罐中，将罐放在温处以加强蒸气的发生。时时震蕩罐子以加速保存效果。这样保存时，材料下端浸入酒精的部分当然不能供研究之用（根据第比利斯植物研究所实验室的实践經驗）。

酒精保存过的材料質脆易碎；因此为了恢复制作切片所要求的足够彈性，将其置于水和甘油的混合溶液中浸泡1—2小时。

材料用酒精保存后常易发生卷縮和褪色，为避免此缺点，可改用福尔馬林。市售的福尔馬林（40%）若作保存剂应用时，宜先用2—3倍蒸餾水将其稀釋。必須将这种液体放在密閉罐的底部。这

样保存时,除花瓣和鞣质(在这种情况下变成褐色)外,材料的颜色大体上都能保持下来。

显微化学研究中,决不可使用干燥材料,但在某些特殊情况下(如試驗細胞核、染色体、木质素、木栓),可以例外。缓慢干燥会促进酶对物质的分解作用;急速干燥可防止这种分解,但却使挥发性成分更多地散失。在干燥过程中,溶液状态的物质要浸染到细胞的外部,逐渐透入并浸润细胞壁。许多正在升华的物质,如果未全部挥发掉,这些物质就会移到原先不含有它们的组织中去,或者形成结晶。显然,干燥材料比用任一上述“湿”法贮备的材料,更为远离生活状态。

制作切片的一般注意事项

显微化学研究用的切片,多半用普通剃刀徒手切成(在特殊情况下,采用铜制或骨制的刀,参看铁的测定一节)。如果材料不便用手执住,可将其夹入接骨骨髓中;如果材料过于粗糙或坚硬,则可将其夹入预先充分煮过的纵向剖开的软木塞中。

干燥材料一般无需任何处理,即可用来切片。就获得薄而匀的切片来说,材料在切片前事先经过各种处理(水浸,稀碱或氨的处理),并不经常都比直接取材料干切(即从植物体上或从材料保存罐中取到材料后,切口不蘸水湿润而直接切片)效果好。上述各种处理,作精细解剖学研究时是必需的,但在显微化学研究中应用时,则应十分慎重。应当考虑到,这些处理有使被检成分浸出或发生化学变化的可能。只有当材料过脆而易于切碎时,才可在切片前把它在湿气软化装置中放置一夜。硫酸干燥器中的硫酸改换水后,或是用玻璃钟罩置于磨砂的(或涂过油脂的)玻璃板上,都可用作湿气软化装置。将一碟水一碟材料放在湿气软化装置中,材料在任何情况下,都不可与水直接接触,而只能由湿气软化装置中的

湿气来湿润。这种软化材料的方法比用水浸或沸水蒸气湿润的软化法,需要更长的时间。但是,它是处理显微化学研究用材料的唯一恰当的方法。因为它能保持细胞内含物的完整,不致使细胞内含物因洗涤、升华与过分膨胀和粘液化等现象(这些现象是在使用其他软化材料方法时同时发生的)而受到损失。

材料可在湿气软化装置中放一昼夜(较硬的材料放2—3昼夜)。放的时间再长一些,也不致有坏的影响,不过在水里要加一点石碳酸,避免发霉。

这个方法的缺点,就是在材料中会留下大量的空气,不得不在制成切片后将其除尽。

如果需要确定某一细胞中存在着某种物质,或该物质在组织中的分布状况,则必须对无损伤的细胞进行显微反应。如果是单个的细胞(单细胞植物、花粉等),为了避免被盖玻片压坏,可在盖玻片下垫支持物(四角各涂以一小滴用3份蜡1份松节油配成的混合物)。也可垫入盖玻片的碎片,作为简便的支撑物。切片中应该至少有一层,而最好是两层完全没有损伤的细胞;因此,切片应当是相当厚的。很长的解剖部分,或巨大的异常细胞和贮藏囊,可以横切。在这种情况下,还要作纵切面观察及表切面观察,以配合横切面观察。将反应切片与对照切片作比较;此外也经常将各种各样的切片相互进行比较,以确定它们对于反应的差异。因此,所有用于研究的切片厚度必须相同,因为厚度不同,颜色的深浅就要受到影响。

持续地观察切片,在许多情况下(例如当反应中析出沉淀或生成结晶时)都是必要的。为此,切片需要连续地检查2—3天,有时甚至要一星期之久。当切片非常缓慢地逐渐干燥时,就会在盖玻片底下,主要是边缘处,逐渐析出结晶。与此相反,在有些情况下,常须防止切片中的试剂蒸发。为此,可用凡士林或蜡与松节油

(3:1)的混合物塗抹蓋玻片的邊緣。懸滴觀察法是較好的觀察方法。懸滴觀察時，若無特殊的磨光凹窩載玻片，亦可用其他辦法解決：先用厚紙作一小框，以水濕潤後放到載玻片上。而後再取一蓋玻片，放上切片且加入一滴試劑，將其倒復在紙制小框上即成。以後視厚紙框的乾燥程度，用少許水直接滴加到紙框外緣將其濕潤。

顯微化學中，有許多專門適用於研究特殊情況的技術操作法，但這裡我們沒有把它們加以介紹。從上面的敘述可以看到，一般說來，顯微化學的技術是非常簡單的，它不致給顯微鏡工作者帶來什麼困難。但由於技術上過分簡單，就可能使人容易忘懷小心從事工作的必要性。顯微化學工作中，我們必須經常記住下面一些簡單的，但却是非常重要的規則：

1. 所研究材料的狀態，必須與新鮮健全的植物狀態極相接近。最好直接取新鮮而健全的植物材料所做的切片進行工作。

2. 必須多次觀察，使不致因機體狀態隨着生長時期、外界條件的影響、機體新陳代謝中的季節變動與晝夜變動而有所變化，以致得到不正確的結論。

3. 制作切片應當不施加他種附加作用，如果發生反應的專門規程中不要求這些作用，那麼不用說，甚至用水蘸濕也是不必要的。

4. 工作用的溶液、試劑、移液管、玻片以及其他用具，應當絕對保持清潔。

5. 事先應當考慮到，除了待測物質外，還有哪些物質可能參與反應，並採取措施除去這些物質（如何除去，在有關章節中提及）。

6. 儘管上面一點已經做到，我們還要採用適當的方法除去切片中的待測物質，以便同時用它們進行對照反應（參見生物礫一章）。

7. 必須養成習慣，把反應的結果用書面詳細記錄下來，並用繪圖器，不褪色的彩色鉛筆或水彩顏料配制簡圖。