



普通高等学校“十四五”规划生命科学类创新型特色教材

植物学实验 (第二版)

Botanical Experiments

刘虹 金松恒 主编



内 容 提 要

本书分为上、下两篇,共六部分。上篇介绍植物学基本实验技术及实验准备,包括光学显微镜及其操作技术、常用的植物制片技术、生物绘图技术以及植物学实验准备;下篇内容为23个植物学实验,包括17个基础验证性实验和6个综合开放性实验,分为植物形态结构与发育及植物分类学两部分。在实验材料的选择上,以南方植物为主,兼顾北方不同地区的部分植物。书后附有常见的高等植物名录。

本书适合生命科学类专业植物学实验教学使用。

图书在版编目(CIP)数据

植物学实验/刘虹,金松恒主编.—2版.—武汉:华中科技大学出版社,2022.11
ISBN 978-7-5680-8774-2

I. ①植… II. ①刘… ②金… III. ①植物学-实验-高等学校-教材 IV. ①Q94-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2022)第178597号

植物学实验(第二版)

刘 虹 金松恒 主编

Zhiwuxue Shiyan(Di-er Ban)

策划编辑:王新华

责任编辑:王新华

封面设计:原色设计

责任校对:刘 竣

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

电话:(027)81321913

武汉市东湖新技术开发区华工科技园

邮编:430223

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:武汉开心印印刷有限公司

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:8.5 插页:4

字 数:235千字

版 次:2022年11月第2版第1次印刷

定 价:32.00元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究



普通高等学校“十四五”规划生命科学类创新型特色教材

编 委 会



主任委员

陈向东 武汉大学教授,2018—2022年教育部高等学校大学生物学课程教学指导委员会秘书长,中国微生物学会教学工作委员会主任

副主任委员(排名不分先后)

胡永红 南京工业大学教授,食品与轻工学院院长

李 钰 哈尔滨工业大学教授,生命科学与技术学院院长

卢群伟 华中科技大学教授,生命科学与技术学院副院长

王宜磊 菏泽学院教授,牡丹研究院执行院长

委员(排名不分先后)

陈大清	郭晓农	李 宁	陆 胤	宋运贤	王元秀	张 明
陈其新	何玉池	李先文	罗 充	孙志宏	王 云	张 成
陈姿暄	胡仁火	李晓莉	马三梅	涂俊铭	卫亚红	张向前
程水明	胡位荣	李忠芳	马 尧	王端好	吴春红	张兴桃
仇雪梅	金松恒	梁士楚	聂呈荣	王锋尖	肖厚荣	郑永良
崔韶晖	金文闻	刘秉儒	聂 桓	王金亭	谢永芳	周 浓
段永红	雷 忻	刘 虹	彭明春	王 晶	熊 强	朱宝长
范永山	李朝霞	刘建福	屈长青	王文强	徐建伟	朱德艳
方 俊	李充璧	刘 杰	权春善	王文彬	闫春财	朱长俊
方尚玲	李 峰	刘良国	邵 晨	王秀康	曾绍校	宗宪春
冯自立	李桂萍	刘长海	施树良	王秀利	张 峰	
耿丽晶	李 华	刘忠虎	施文正	王永飞	张建新	
郭立忠	李 梅	刘宗柱	舒坤贤	王有武	张 龙	



普通高等学校“十四五”规划生命科学类创新型特色教材

作者所在院校

(排名不分先后)

- | | | | |
|-----------|----------|------------|----------|
| 北京理工大学 | 华中科技大学 | 云南大学 | 辽宁大学 |
| 广西大学 | 南京工业大学 | 西北农林科技大学 | 燕山大学 |
| 广州大学 | 暨南大学 | 中央民族大学 | 临沂大学 |
| 哈尔滨工业大学 | 首都师范大学 | 郑州大学 | 山西医科大学 |
| 华东师范大学 | 湖北大学 | 新疆大学 | 宁夏大学 |
| 重庆邮电大学 | 湖北工业大学 | 青岛科技大学 | 重庆第二师范学院 |
| 滨州学院 | 湖北第二师范学院 | 青岛农业大学 | 齐鲁理工学院 |
| 河南师范大学 | 湖北工程学院 | 青岛农业大学海都学院 | 六盘水师范学院 |
| 嘉兴学院 | 湖北科技学院 | 山西农业大学 | 河西学院 |
| 武汉轻工大学 | 湖北师范大学 | 陕西科技大学 | 广西贵港工业学院 |
| 长春工业大学 | 汉江师范学院 | 陕西理工大学 | |
| 长治学院 | 湖南农业大学 | 上海海洋大学 | |
| 常熟理工学院 | 湖南文理学院 | 塔里木大学 | |
| 大连大学 | 华侨大学 | 唐山师范学院 | |
| 大连工业大学 | 武昌首义学院 | 天津师范大学 | |
| 大连海洋大学 | 淮北师范大学 | 天津医科大学 | |
| 大连民族大学 | 淮阴工学院 | 西北民族大学 | |
| 大庆师范学院 | 黄冈师范学院 | 北方民族大学 | |
| 佛山科学技术学院 | 惠州学院 | 西南交通大学 | |
| 阜阳师范大学 | 吉林农业科技学院 | 新乡医学院 | |
| 广东第二师范学院 | 集美大学 | 信阳师范学院 | |
| 广东石油化工学院 | 济南大学 | 延安大学 | |
| 广西师范大学 | 佳木斯大学 | 盐城工学院 | |
| 贵州师范大学 | 江汉大学 | 云南农业大学 | |
| 哈尔滨师范大学 | 江苏大学 | 肇庆学院 | |
| 合肥学院 | 江西科技师范大学 | 福建农林大学 | |
| 河北大学 | 荆楚理工学院 | 浙江农林大学 | |
| 河北经贸大学 | 南京晓庄学院 | 浙江师范大学 | |
| 河北科技大学 | 辽东学院 | 浙江树人学院 | |
| 河南科技大学 | 锦州医科大学 | 浙江中医药大学 | |
| 河南科技学院 | 聊城大学 | 郑州轻工业大学 | |
| 河南农业大学 | 聊城大学东昌学院 | 中国海洋大学 | |
| 石河子大学 | 牡丹江师范学院 | 中南民族大学 | |
| 菏泽学院 | 内蒙古民族大学 | 重庆工商大学 | |
| 贺州学院 | 仲恺农业工程学院 | 重庆三峡学院 | |
| 黑龙江八一农垦大学 | 宿州学院 | 重庆文理学院 | |

第二版前言

植物学是生命科学类所有专业的一门基础课,也是与人们日常生活关系最密切的课程之一,学好植物学将终生受益。植物学是历史悠久的传统学科,人们的饮食健康、中医药保健、养生怡情、户外旅游乃至常见重大疾病的中医防治等,都离不开植物学的基础知识。

在华中科技大学出版社的大力支持下,我们于2014年出版了《植物学实验》教材,并于2022年修订再版。该实验教材同时也是张彦文、周浓主编的《植物学》的配套教材,内容分为上、下两篇,包括植物学基本实验技术与实验准备,植物细胞、组织、营养器官和生殖器官的形态结构,植物界各大类群特征及分类等。这些实验较好地涵盖了植物形态结构与发育和植物系统分类学的基本内容,着重培养学生的基本实验技能和独立工作能力,可对激发学生兴趣、培养动手能力起到积极的作用。

本书内容简明扼要,全书共收录23个实验,其中验证性实验是重要的基础实验,是必不可少的。除了验证课堂知识,我们还要求学生掌握植物学的基本研究方法,培养学生对植物界的基本观察和分析能力。因此,除收录了17个基础验证性实验外,还收录了6个综合开放性实验(实验12、13、17、18、22、23)。无论哪一类实验,都要求学生掌握扎实的植物学基础知识和实验技能,具备较强的动手能力。因此,本教材将光学显微镜的操作和使用、徒手切片和临时装片、生物绘图以及实验准备等内容放在最前面。每个实验均配有与实验内容密切相关的图表,如形态解剖部分的横切面或纵切面图、分类学部分的植物彩图等,以此增强学生的感性认识,帮助学生更好地掌握实验要点,快速而准确地获得正确的实验结果。各学校可以根据自身的教学要求、实验条件及本地植物种类的特点,相应增减实验内容或选择其他当地更易获得的植物材料来完成实验,并对实验的顺序予以调整或合并。

本书第二版仍由刘虹、金松恒主编。编者是来自国内9所高等院校的植物学课程骨干教师。全书由刘虹负责统稿,夏婧和尚宏芹等审核。教材中部分文字内容及黑白插图借鉴了国内外相关教材和专著(详见参考文献),在此向这些文献的作者表示诚挚的谢意。本书植物分类学部分所用的彩图由刘虹、廖廓拍摄,书稿中的部分黑白图片由王永飞、刘虹等拍摄。

由于编者水平有限,本书难免有不妥之处,敬请大家批评指正,多提宝贵意见,以便修正。

编者

2022年8月

目录

上篇 植物学基本实验技术与实验准备

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 /2
- 1.2 光学显微镜的使用 /3
- 1.3 常用光学显微镜的种类 /5
- 1.4 显微测量技术 /6
- 1.5 光学显微镜的性能指标 /7

2 常用的植物制片技术 /9

- 2.1 临时封片和徒手切片 /9
- 2.2 石蜡切片 /10
- 2.3 整体封固制片 /12
- 2.4 组织离析制片 /13
- 2.5 分生组织压片 /14
- 2.6 植物材料整体透明技术 /14

3 生物绘图技术 /16

- 3.1 手工绘图 /16
- 3.2 计算机绘图 /17

4 植物学实验准备 /33

- 4.1 植物学实验须知 /33
- 4.2 植物学实验材料的准备 /34
- 4.3 植物学实验常用试剂的配制 /37
- 4.4 常用的植物学实验教学仪器 /42

下篇 植物学实验

5 植物形态结构与发育 /44

- 实验1 植物细胞结构的显微观察 /44
- 实验2 植物细胞中后含物的显微观察 /48

- 实验 3 植物细胞的分裂 /51
- 实验 4 植物组织 /55
- 实验 5 种子的萌发与结构 /60
- 实验 6 种子生活力的快速测定 /63
- 实验 7 根的形态与结构 /65
- 实验 8 茎的形态与结构 /70
- 实验 9 叶的形态与结构 /74
- 实验 10 花的组成与花粉萌发 /77
- 实验 11 胚的发育及果实的结构与类型 /81
- 实验 12 C_3 和 C_4 植物叶的比较解剖 /85
- 实验 13 种子植物营养器官对不同生境的适应对策 /86

6 植物分类学 /89

- 实验 14 藻类、菌类和地衣 /89
- 实验 15 苔藓植物 /94
- 实验 16 蕨类植物 /98
- 实验 17 植物检索表的编制及应用 /100
- 实验 18 裸子植物的观察 /104
- 实验 19 双子叶植物之离瓣花亚纲 /106
- 实验 20 双子叶植物之合瓣花亚纲 /110
- 实验 21 单子叶植物纲 /113
- 实验 22 种子植物标本的采集、制作与保存 /116
- 实验 23 校园植物的观察与识别 /121

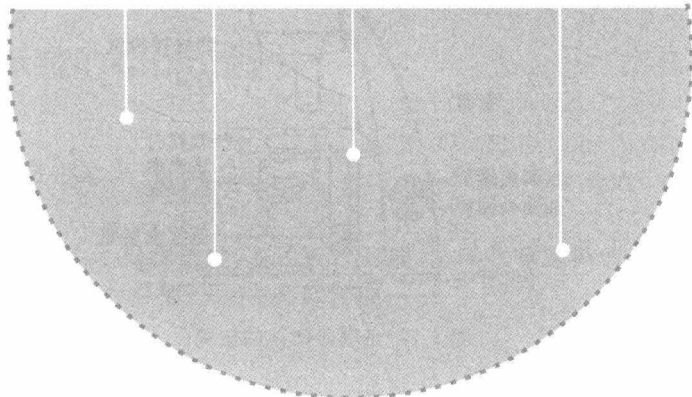
附录 常见高等植物名录 /123

参考文献 /128

彩图 /129

上 篇

植物学基本实验技术 与实验准备



1.1 光学显微镜的基本结构

通常使用的光学显微镜(图 1-1),其结构分为机械部分和光学部分。

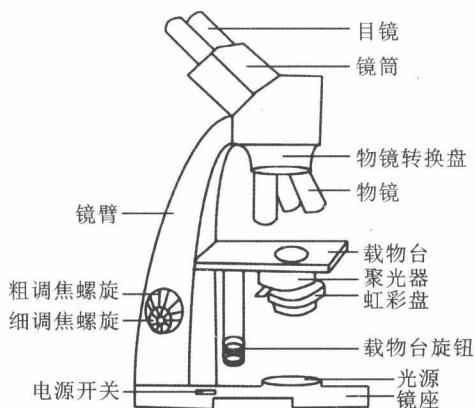


图 1-1 光学显微镜的结构

1. 机械部分

(1) 镜座:显微镜最下面的马蹄形部分,用来固定和支持镜体。

(2) 镜臂:取放或移动显微镜时手握的部位,一般呈弓形,也称执手。

(3) 载物台:位于显微镜中部,放置载玻片的方形或圆形平台。中央有一个圆孔,即通光孔,光线由此孔通过,台上两侧有用以固定制片的推进器。

(4) 镜筒:为一个金属圆筒,连接在镜臂上,下接物镜转换盘。

(5) 物镜转换盘:可以任意转动,上面安装有 3~4 个物镜,使用时根据需要可更换放大倍数不同的物镜。

(6) 调焦螺旋:装在镜臂下部两旁,通过转动,调节焦距,有大、小两对,大的叫粗调焦螺旋(粗调节螺旋),转动一周可使镜筒升降 10 mm,小的叫细调焦螺旋(细调节螺旋),每转动一周可使镜筒升降 1 mm。

(7) 眼距调节装置:为调节 2 个目镜之间距离的装置,紧邻目镜的下方,调节该装置可以使 2 个目镜之间的距离与人眼瞳距相符合。

2. 光学部分

(1) 目镜:装于镜筒上端,上面刻有号码,表示放大的倍数,如“10×”“16×”等,可根据需

要选择使用不同的放大倍数,通常使用的为10倍目镜。

(2) 物镜:安装在物镜转换盘的螺旋孔上,一般有4个物镜,即低倍镜($4\times$ 、 $10\times$)、高倍镜($40\times$)、油镜($100\times$),物镜下端的镜孔越小,放大的倍数越大。植物学实验一般不用油镜,多用低倍镜和高倍镜,一般先在低倍镜(4倍镜头或10倍镜头)下找到物体,并调焦观察清楚,再转换到高倍镜(40倍镜头)下仔细观察。

物镜上标注的数字表示镜头的主要性能参数。如10倍镜头上的数字“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,该数值越大则分辨率越高);“160”为镜筒长度(mm),“0.17”为所要求的盖玻片厚度。

(3) 聚光器:在载物台下,由透镜组成,可以聚集反光镜反射来的光线,照明玻片标本。

(4) 虹彩光圈(虹彩盘):聚光器下装有虹彩光圈,推动其上的小柄可使光圈任意开大或任意缩小,以调节光线强弱。

(5) 光源:一般安装在镜座上,镜座上有开关和一个调节亮度的旋钮。旧式的显微镜没有附加光源,在它的镜座上有一个反光镜,用来控制自然光的方向和强弱。

1.2 光学显微镜的使用

1.2.1 光学显微镜的操作流程

1. 显微镜的放置

位置:镜座距实验台边缘3~4 cm。

要求:

- (1) 取、放显微镜时应右手握住镜臂,左手托住底座,忌单手拿显微镜;
- (2) 镜检者姿势要端正,双眼同时睁开观察物像。

2. 低倍镜头的使用

- (1) 接通电源,打开光源开关。
- (2) 放玻片于载物台,用玻片夹夹住;调节标本移动螺旋,使观察的目的物处于物镜的正下方。
- (3) 调节粗调焦螺旋,使物镜($10\times$)与标本靠近。注意:要注视物镜,防止物镜、载玻片碰撞。

(4) 睁开双眼向目镜里面观察。注意细调焦螺旋和聚光器的使用,以获得清晰的图像。

(5) 通过标本移动螺旋慢慢移动玻片,认真观察标本各部分。

(6) 寻找合适目标,仔细观察,并绘图或记录所观察到的结果。

3. 高倍镜头的使用

(1) 旋动物镜转换盘换高倍镜观察。

(2) 如果高倍镜触及载玻片,应立即停止旋转,这说明原来低倍镜的焦距并没有调准,目的物并没有真正找到,必须换用低倍镜重新调节。

(3) 如果高倍镜下观察目的物有点模糊,调节细调焦螺旋,直到视野清晰。

(4) 如果使用高倍镜仍未能看清目的物,可换用油镜观察。先用低倍镜和高倍镜检查标本片,将目的物移到视野正中央。

(5) 注意不要快速地下降镜头,不能用力过猛,以免损坏镜头及载玻片。

4. 油镜的使用

(1) 在载玻片上滴一滴香柏油。

(2) 将油镜头移至正中央,缓慢调节粗调焦螺旋使油镜头浸没在油中,刚好贴近载玻片。

(3) 再用细调焦螺旋微微向上调至能看清目的物为止。此时不要再用粗调焦螺旋。

5. 镜头的保养

(1) 油镜观察完毕,用擦镜纸将镜头上的油揩净,不要来回反复擦。

(2) 用擦镜纸蘸少许乙醇或乙醚揩拭镜头,再用 3~4 片擦镜纸揩干;低倍镜和高倍镜沾上异物后的保养同本步骤。

6. 实验结束

(1) 观察结束后,调节光源亮度到最小,再关掉电源开关,拔出电源插头。

(2) 再调节粗调焦螺旋,使载物台下降到最低。

(3) 取下玻片,用擦镜纸蘸取几滴乙醇或乙醚将镜头擦干净。

(4) 罩上防尘罩,然后放回原处。

(5) 在记录本上登记本次实验的时间、课程、实验名称、使用者姓名和显微镜是否完好等。

1.2.2 光学显微镜的合轴调节

对于光学显微镜的光学部分,在实验过程中应注意合轴调节。合轴调节又叫中心调节,也就是使目镜、物镜、聚光器的主光轴和可变光阑的中心点位于一条直线上。如果光轴不在一条直线上,会使相差增加,亮度降低,图像模糊。

合轴调节的方法:将可变光阑孔开至最大,把低倍物镜转入光轴(可听到“咔嚓”声,即为转入光轴),使物镜和载物台间的距离约为 5 mm,不放标本,调节反射镜的角度,使视场最亮,然后拔掉目镜,直接从镜筒中观察,一边把可变光阑孔慢慢缩小并多次打开。当可变光阑孔关至最小时,光阑孔的像只有一个亮点,这个亮点应正好落在物镜的通光孔的中心。当可变光阑孔开大到一定程度时,光阑孔的像应正好与物镜通光边缘的黑圈相重合。若符合上述两个条件,就说明它们合轴了。否则,还需要调整。由于目镜和物镜都是固定的,不能调节,主要调整聚光器的位置,有些显微镜的聚光器支架两旁有两个光轴校正螺丝,调整这两个螺丝,就能使它们合轴;有些显微镜聚光器是由框架上三个相隔 120°角的螺丝固定的,其中一个装有弹簧可以伸缩,另外两个可以旋转,调整这三个螺丝就可以使聚光器在水平面上移动位置,从而达到合轴。显微镜的光学部分合轴调节好后,如果没有卸载聚光器或其他特殊原因,不必经常校正。

1.2.3 光学显微镜操作注意事项

(1) 取镜:拿取显微镜时,必须一手紧握镜臂,另一手平托镜座,使镜体保持直立,轻轻放在实验桌距桌子边 3~4 cm 偏左的位置,然后检查镜体各部分是否完好。镜体上的灰尘可用软布擦拭。镜头应用擦镜纸擦拭,千万不要用手去摸镜头的透镜部分。不使用显微镜时,要将其用绸巾或纱布盖好。

(2) 对光:使用时,先将低倍镜头转到载物台的中央,正对通光孔。用左眼接近目镜观察,同时用手调节光源强弱,使镜内的光亮度适宜,镜内可见明亮的圆面。

(3) 放玻片:将载玻片放在载物台上,并使观察部分对准物镜,用压片夹或十字移动架固定载玻片。切记载玻片的反面不能沾有水,否则会与载物台黏合过紧而导致不能移动载玻片。

(4) 还镜:使用完毕后,先将镜筒提升,取下切片,把显微镜擦拭干净,各部分恢复原位,使低倍物镜(一般为4倍物镜)转至中央通光孔,然后将镜筒下降,降下载物台,将光强调至最弱,关掉电源开关,拔下电源插头,收好显微镜并罩上防尘罩,装入显微镜盒子中。

(5) 正确区别显微镜下的气泡和细胞结构。在载玻片上滴一滴稀胶水,用解剖针搅拌使其产生小的气泡,加盖玻片后在显微镜下观察。在显微镜下看到的气泡,其外围为一个黑圈,中间为明亮部分。应该记住气泡在显微镜下的形态,在以后的实验中,不要把气泡误认为细胞或组织中的结构。

(6) 其他注意事项:

① 任何旋钮转动有困难时,绝不能用力过大,而应查明原因,排除障碍。如果自己不能解决,要向指导老师说明,请求帮助;

② 保持显微镜镜头的清洁,尽量避免灰尘落到镜头上,否则容易磨损镜头;

③ 尽量避免试剂或溶液沾污或滴到显微镜上,这些都能损坏显微镜;

④ 高倍物镜很容易被染料或试剂沾污,如被沾污,应立即用擦镜纸擦拭干净,显微镜用过,应用清洁棉布轻轻擦拭(不包括物镜和目镜镜头);

⑤ 光学玻璃的硬度比一般玻璃的小,易于损伤,擦拭光学透镜时,只能用专用的擦镜纸,不能用棉花、棉布或其他物品擦拭,擦时要先将擦镜纸折叠为2~4折,从一个方向轻轻擦拭镜头,每擦一次,擦镜纸就要折叠一次。

1.3 常用光学显微镜的种类

1. 明视野显微镜

明视野显微镜(bright field microscope)是最通用的一种光学显微镜,即通常所说的普通光学显微镜。它利用光线照明,不对光的性质作任何改变,标本中各点依其光吸收的不同在明亮的背景中成像。它由物镜、目镜、聚光器、光源、载物台和支架等部件组成。其中聚光器用于调节显微镜的照明,物镜和目镜是放大微小物体成像的主要部件。一般未经染色处理的生物标本,由于对光线的吸收很少,造成反差低的影像,不利于明视野显微镜观察。使用染料对生物标本染色后增加了反差,这种染色后的生物标本成为明视野显微镜的主要观察对象。

2. 暗视野显微镜

暗视野显微镜(dark field microscope)是光学显微镜的一种,也叫超显微镜。暗视野显微镜的聚光器中央有挡光片,使照明光线不直接进入物镜,只允许被标本反射和衍射的光线进入物镜,因而视野的背景是黑的,物体的边缘是亮的。利用这种显微镜能见到小至4~200 nm的微粒,分辨率可比普通光学显微镜高50倍。暗视野显微镜的基本原理是丁铎尔效应。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”,这种现象即丁铎尔效应。

3. 相差显微镜

相差显微镜是用于观察未染色标本的显微镜。活细胞和未经染色的生物标本,因细胞各部细微结构的折射率和厚度不同,光波通过时,波长和振幅并不发生变化,仅相位发生变化(振

幅差),这种振幅差人眼无法观察。而相差显微镜通过改变这种相位差,并利用光的衍射和干涉现象,把相差变为振幅差来观察活细胞和未经染色的标本。相差显微镜和普通光学显微镜的区别:用环状光阑代替可变光阑,用带相板的物镜代替普通物镜,并带有一个合轴用的望远镜。

相差是指同一光线经过折射率不同的介质时其相位发生变化并产生的差异。相位指在某一时间上,光的波动所达到的位置。一般由于被检物体(如不染色的细胞)所能产生的相差太小,肉眼很难分辨,只有在变相差为振幅差(明暗差)之后才能被区分。相差取决于光波所通过介质的折射率之差及其厚度,等于折射率与厚度的乘积之差(即光程之差)。而相差显微镜就是利用被检物的光程之差进行镜检的。

4. 实体显微镜

实体显微镜又称“解剖镜”“体视显微镜”“立体显微镜”或“操作和解剖显微镜”,它是一种具有正像立体感的显微镜。实体显微镜的倍率变化是由改变中间镜组之间的距离而获得的,其总的光学放大倍数为10~150。这类显微镜的放大倍数较小,可在较大的视野内观察标本,并且观察到的像为正像,与人眼的视觉效果相同,故被广泛地用于生物学各领域。

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。其光学系统包括初级物镜、中间变焦镜、转换棱镜和目镜等。实体显微镜有两套目镜和一个大的物镜,目镜与物镜之间各有一组三棱镜,能使光路所形成的倒像转为正像,与实物一致,加上两眼可以同时观察,光源是落射光,所以实体感强,又可边解剖边观察,非常方便。根据应用的要求,实体显微镜还可增加荧光、照相、摄像、冷光源等功能。

5. 荧光显微镜

荧光显微镜(fluorescence microscope)以紫外线为光源,用以照射被检物体,使之发出荧光,然后在显微镜下观察物体的形状及其所在位置。荧光显微镜用于研究细胞内物质的吸收、运输、化学物质的分布及定位等。细胞中有些物质(如叶绿素等),受紫外线照射后可发荧光;还有一些物质本身虽不能发荧光,但用荧光染料或荧光抗体染色后,经紫外线照射也可发荧光。荧光显微镜就是对这类物质进行定性和定量研究的工具之一。

6. 激光共聚焦显微镜

激光共聚焦显微镜也称激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)用激光做扫描光源,逐点、逐行、逐面快速扫描成像,扫描的激光与荧光收集共用一个物镜,物镜的焦点即扫描激光的聚焦点,也是瞬时成像的物点。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,这些图像信息都储存于计算机内,通过计算机分析和模拟,就能显示细胞样品的立体结构。

激光共聚焦显微镜是近代最先进的细胞生物医学分析仪器之一。它是在荧光显微镜成像的基础上加装激光扫描装置,使用紫外光或可见光激光荧光探针,利用计算机进行图像处理,不仅可观察固定的细胞、组织切片,还可对活细胞的结构、分子、离子进行实时动态观察和检测。目前,激光扫描共聚焦显微技术已用于细胞形态定位、立体结构重组、动态变化过程等研究,并提供定量荧光测定、定量图像分析等实用研究手段,结合其他相关生物技术,在形态学、生理学、免疫学、遗传学等分子细胞生物学领域得到广泛应用。

1.4 显微测量技术

要利用显微镜进行显微测量,必须具有镜台测微尺和目镜测微尺。镜台测微尺是一个特

制的载玻片,中央有 1 mm 长并均分为 100 格的刻度线。每一个小格就是 $10\ \mu\text{m}$ 。

目镜测微尺是一个直径为 20~21 mm 的具有标尺的圆形玻片,可以放入目镜筒内。它的标尺有直线式和网格式。直线式的可以测量长度,网格式的可以测量数目和面积。

测量长度时,首先将目镜测微尺正面放入目镜筒中。然后将镜台测微尺置于载物台上,使镜台测微尺的标尺刻度清晰可见,移动镜台测微尺,使镜台测微尺的标尺刻度与目镜测微尺的标尺刻度重叠起来,选取二者刻度线正好完全重合的一段,计算重合线间的格数。

目镜测微尺的格值 = 镜台测微尺两重合线间的格数 $\times 10\ \mu\text{m}$ / 目镜测微尺两重合线间的格数

如目镜测微尺的零点刻度和镜台测微尺的重合,目镜测微尺的第 50 格和镜台测微尺的第 65 格重合,此时镜台测微尺 65 格的长度是 $650\ \mu\text{m}$,则目镜测微尺的格值是 $650/50\ \mu\text{m} = 13.5\ \mu\text{m}$ 。算出目镜测微尺的格值以后,就可以移去镜台测微尺,测量视野中物体的大小。如果细胞的宽度占目镜测微尺的 2 格,它的宽度就是 $27\ \mu\text{m}$ 。

在显微测量过程中,当变换物镜或目镜的放大倍数时,必须重新校正目镜测微尺的格值,然后进行测量。

1.5 光学显微镜的性能指标

光学显微镜的主要性能包括分辨率、数值孔径、放大率和有效放大率、焦深、视场直径、覆盖差、工作距离等。

1. 分辨率

分辨率是能够区分的相近两点间的最小距离。能区分的两点间的距离越小,显微镜的分辨率越高。显微镜分辨率的公式:

$$R = 0.61\lambda / (n \sin\alpha)$$

式中: R 是分辨率; λ 是光波波长; n 是物镜和被检物质之间介质的折射率; α 为透镜角孔径,它是光轴上标本的一个点发出的光线和物镜直径两端形成的夹角的一半。

2. 数值孔径

数值孔径(numerical aperture, NA)也称为物镜的镜口率,是物镜框口能够纳进的光通量的大小。数值孔径等于 $n \sin\alpha$,它是物镜和聚光器的主要参数,一般标在物镜的外壳上。数值孔径越大,物镜的分辨率越高。干燥物镜的数值孔径为 0.05~0.95,油(香柏油)浸物镜的数值孔径为 1.25。数值孔径与分辨率成正比,与放大率成正比,与焦深成反比。数值孔径增大,视场直径与工作距离都会相应地变小。

3. 放大率和有效放大率

放大率也称放大倍数,是指最终成像的大小与原物体大小的比值。显微镜的放大倍数等于目镜放大倍数和物镜放大倍数的乘积。显微镜放大倍数的极限就是有效放大率。物体最后被放大的倍数为目镜和物镜二者放大倍数的乘积。理论上显微镜的最大放大倍数可以达到 2000 多,但是目前不仅由于受分辨率的限制,还由于制造工艺水平的限制,最好的显微镜的最高有效放大倍数,只能达到 1000 左右。因此,有时说一架显微镜可以放大 2000 倍,这只不过是说能够“放大”而已,并不能说明它的清晰程度增大,也许只能看见一个放大的模糊图像。

4. 焦深

当焦点对准物体的某一点时,位于该点平面上的各点可以看清楚,而且此平面的上下一定厚度内的各点也可以看清楚。这个清晰部分的厚度就是焦点深度,简称焦深。焦深与放大倍数和数值孔径成反比。因此,当放大倍数更高时,看到的厚度更薄。

5. 视场直径

视场直径也称视场宽度,是指在显微镜下看到明亮圆形视场内所能容纳被检物体的实际范围。它的大小是由目镜的视场光阑决定的。视场直径愈大,愈便于观察。

$$\text{视场直径} = \text{目镜视场数} / \text{物镜倍率}$$

6. 覆盖差

由于盖玻片的厚度不标准,光线从盖玻片进入空气产生折射后的光路发生了改变,从而产生了相差,这就是覆盖差。国际上规定,盖玻片的标准厚度为 0.17 mm,许可范围为 0.16~0.18 mm,在物镜的制造上已将此厚度范围的相差计算在内。物镜外壳上标的“0.17”,即表明该物镜所要求的盖玻片的厚度。

7. 工作距离

工作距离(WD)也叫物距,指物镜前透镜的表面与被检物体之间的距离。

显微镜放大的倍数是由目镜、物镜和镜筒的长度所决定的。镜筒长度一般为 160 mm。常用的显微镜,其物镜与目镜上都刻有放大倍数。一般物镜越长,目镜越短,放大倍数越高。

制片是观察植物内部形态结构的主要方法之一,植物学实验常用的制片技术有临时封片、徒手切片、石蜡切片、整体封固制片、组织离析制片、分生组织压片和植物材料整体透明技术等七种。根据植物材料的大小和厚薄等特征,可以采用不同的植物制片技术。

2.1 临时封片和徒手切片

2.1.1 临时封片

临时封片可以用于临时观察新鲜的植物材料,制片快速而简单,尤其适合观察活体材料。

制作临时封片的基本方法如下。

(1) 准备好载玻片、盖玻片,擦拭时要小心,避免弄碎玻片或者留手印在玻片上。

(2) 在载玻片中央滴一滴蒸馏水(不作无菌要求时可用自来水),用镊子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,这样可以避免混入气泡。如盖玻片水分不足,可在盖玻片一侧边缘适量添加水分;如果水分过多,可以用吸水纸吸掉多余的水。如果制作的材料较薄,可以适当调整显微镜光圈,增大反差,以便观察清楚。

常用的临时封片方法有涂抹法和撕片法。此外,还有指甲油印迹法。

(1) 涂抹法适合观察极小的植物体或组织,如细菌、酵母、花粉、淀粉、晶体等。首先用解剖针挑取或用解剖刀刮取材料置于载玻片上,然后用解剖针均匀涂成一薄层,加入一滴清水,盖上盖玻片即可观察。

(2) 撕片法适用于植物的肉质化茎、叶,它们的表皮容易撕下来,如洋葱鳞茎、蚕豆叶等。具体过程:用手或镊子撕下洋葱鳞茎向内的表皮,剪成 3.0~5.0 mm 的小片,迅速移到载玻片上已滴好的水滴中(注意表皮的外面应朝上),并用解剖针和镊子将表皮展开,盖上盖玻片即可观察。

(3) 对于不容易撕下来的表皮可以采用指甲油印迹法来观察。采用指甲油印迹法可以观察植物干燥叶片的表皮结构或者不容易撕下来的植物叶片表皮。将指甲油薄薄地涂在叶片的表皮上,让其自然干燥,一般 5 min 左右,然后用镊子撕下指甲油薄片,放在载玻片上的水滴上,盖上盖玻片,进行观察。

2.1.2 徒手切片

1. 徒手切片的工具和材料

徒手切片的工具包括双面刀片、培养皿、载玻片和盖玻片、毛笔、解剖针、镊子等。选择质量好的刀片对获得高质量的切片非常重要,培养皿用来盛水。实验材料则要有代表性,软硬适中,便于切片。

2. 徒手切片的方法和过程

对于具有一定厚度的植物材料,又不容易撕下来的部位,可以采用徒手切片法来临时观察,其操作如下。

(1) 将植物材料切成 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm} \times (1.0 \sim 2.0)\text{ cm}$ 的长方条。如果是叶片,则把叶片切成 0.5 cm 宽的窄条,夹在胡萝卜(或者土豆、萝卜)等长方条的切口内。

(2) 取上述一个长方条用左手的拇指和食指拿着,使长方条上端露出 $1.0 \sim 2.0\text{ mm}$ 长,并以无名指顶住材料。用右手拿着刀片的一端。

(3) 在材料上端和刀刃上先蘸些水,并使材料呈直立方向,刀片呈水平方向,自外向内把材料上端切去少许,使切口成光滑的断面,并在切口蘸水,接着按同法把材料切成极薄的薄片(愈薄愈好)。切时要用臂力,不要用腕力及指力,由左前方向右后方拉切;拉切的速度宜较快,不要中途停顿。把切下的切片用小镊子或解剖针拨入表面皿的清水中。切时材料的切面经常蘸水,起润滑作用。

初切时必须反复练习,并多切一些,从中选取最好的薄片进行装片观察。

如需染色,可把薄片放入盛有染液的培养皿内,染色约 1 min ,轻轻取出放入另一个盛清水的培养皿内漂洗,即可装片观察。也可以在载玻片上直接染色,即先把薄片放在载玻片上,滴一滴染液。约 1 min 后,倾去染液,再滴几滴清水,稍微摇动,再把清水倾去,然后再滴一滴清水,盖上盖玻片,便可镜检。

2.2 石蜡切片

石蜡切片是一项传统的生物制片技术,已有 100 多年的历史。其操作是将植物材料包埋在石蜡中,用石蜡切片机连续切片,将材料切成 $2 \sim 4\ \mu\text{m}$ 厚的薄片。石蜡切片的制作一般需要一周左右的时间。

2.2.1 石蜡切片所需的药品和仪器

1. 石蜡切片所需的药品

(1) 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(38%甲醛溶液)、冰醋酸、苦味酸、铬酸、重铬酸钾、氯化汞、氯仿、饿酸等。

(2) 脱水剂:常用不同浓度的乙醇来脱水。

(3) 透明剂:常使用二甲苯。

(4) 包埋剂:常使用石蜡。

(5) 粘片剂:明胶。