

第一章 植物生物学实验基本技术

第一节 光学显微镜基本结构及使用方法

根据光源不同，显微镜分为光学显微镜和电子显微镜，前者以可见光为光源，后者以电子束为光源。在一般的实验教学中，普遍使用光学显微镜。

根据结构不同，光学显微镜分为单式显微镜和复式显微镜。单式显微镜是一种结构相对简单的显微镜，如放大镜，主要由一个透镜组成。体式显微镜属于复式显微镜，结构相对复杂，主要由几个透镜组成，放大倍数在 200 倍以下，成像为正立的虚像，在生物学中常用于解剖操作和植物形态的观察。复式显微镜结构比单式显微镜复杂，由两组以上透镜构成，最高分辨率可达到 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ ，最终成像为倒立的虚像，在生物学中主要用于观察细胞结构、组织等显微结构。

一、体式显微镜

（一）体式显微镜的基本结构

体式显微镜主要由机械系统部分和光学系统部分构成（图 1-1），机械系统部分由底座、载物台、调焦旋钮、倍率调节器等组成，光学系统部分由目镜、物镜、棱镜、入射光和透射光组成。

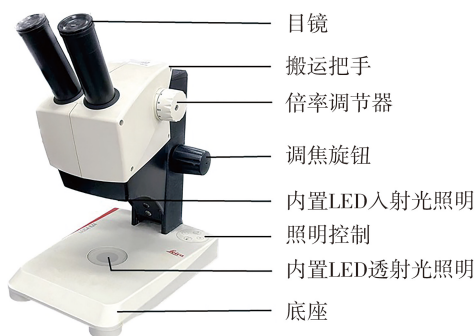


图 1-1 体式显微镜



（二）体式显微镜的使用步骤

1. 取镜时，应右手握住镜臂，左手托住底座，保持镜体直立，小心、平稳地放置在实验台上。将体式显微镜放置在实验台面左侧，实验台面右侧位置用于观察记录或绘图。

2. 插上电源，打开电源开关，将待观察物品（如采集到的校园花朵）放置在载物台中间。根据需要解剖的样品特性，通过照明控制台选择光源及光照亮度。

3. 将放大倍率调节器设为最小值。

4. 通过调焦旋钮将工作距离设为 100 mm 左右，通过目镜一边观察标本一边缓慢转动调焦旋钮，直至视野中能观察到较为清晰的图像。如视野中不是单一圆环图像，双手对目镜进行靠拢或分开，调整左右目镜确定瞳距使视野中为单个圆环图像。

5. 通过倍率调节器，调节观察物品的放大倍率。

6. 再次通过调焦旋钮进行微调焦，使视野中能观察到清晰的图像。

7. 使用完毕后，将倍率调节器调到最小值，通过调焦旋钮将工作距离调到最大值，关闭电源开关，使用纱布对体式显微镜载物台进行清洁，收纳电源线后还镜。还镜时，应右手握住镜臂，左手托住底座，小心放入镜柜。

二、复式显微镜

（一）复式显微镜的基本结构

复式显微镜（以下简称显微镜）主要由机械系统部分和光学系统部分构成（图 1-2）。



图 1-2 复式显微镜

1. 机械系统部分

（1）镜座：主要用于稳固显微镜镜体，使之平稳放置在操作台上。



(2) 镜臂：镜臂呈弯曲状，上连镜筒，下接镜座，中间连接载物台，同时设计有搬运把手，便于取、放显微镜。

(3) 镜筒：镜筒上端用于安装目镜，下端连接物镜转盘，主要作用是保护成像的光路与亮度。

(4) 物镜转盘：转盘上可装配不同放大倍率的物镜，可自由转动，方便观察者快速切换不同的物镜。

(5) 载物台和推进器：用于放置待观察的玻片标本，中央有一个通光孔，并配有压片夹固定标本。通过推进器可以使载物台前后左右移动，对待观察标本进行精确定位。

(6) 调焦旋钮：镜臂两侧各有一对粗调旋钮和细调旋钮。通过调焦旋钮可使载物台升降，以达到最适宜的工作距离，以获得清晰的物像。使用时，应先调整粗调旋钮，再调整细调旋钮。

2. 光学系统部分

(1) 目镜：目镜安装在镜筒上，主要作用是将物镜所成的像进一步放大，常用的是 $\times 10$ 固定目镜， $\times$ 表示放大倍数。目镜上配备屈光度调节环，可以调整并补偿观察者左右眼的视力差异。目镜筒可以水平向外或向内拉动，以调节和适应观测者的瞳距。

(2) 物镜：物镜是决定显微镜性能的最重要部件，安装于物镜转盘上，主要作用是将观察到的物品进行第一次放大成像。常用的低倍物镜为 $\times 4$ 和 $\times 10$ ($\times$ 表示放大倍数， $\times 4$ 表示放大 4 倍，余同)，高倍物镜为 $\times 40$ 和 $\times 100$ 。其中， $\times 100$ 镜头为油浸物镜，也称之为油镜，需要辅以专用镜油作为介质以增加折射率。

不同放大倍数的物镜具有不同的数值孔径 (NA)，一般会在物镜镜体上直接标注。数值孔径是物镜的一个重要参数，影响显微镜的分辨率。数值孔径越大，工作距离越小，分辨率越高。

(3) 光源：光源内置在显微镜镜座里，为 6 V、20 W 卤素灯泡。

(4) 聚光镜：聚光镜装在载物台通光孔下方，主要由聚光器和虹彩光圈 (孔径光阑) 组成，其作用是将反光镜所反射的光线汇集成束，聚焦在被观察物上，使视野的光线均匀明亮。通过聚光器侧边的旋钮可使聚光器升降来调节光线，从而控制视野范围。使用高倍镜时，视野范围小，则上调聚光器，反之则下调。通过旋转内置式孔径光阑，可以使光圈扩大或缩小，借以调节通光量。



（二）显微镜的使用步骤

1. 取镜

从镜柜中取镜，右手握住搬运把手，左手托住镜座，保持镜体直立，小心平稳放置在实验台上。将显微镜放置在实验台面左侧，实验台面右侧位置用于观察记录或绘图。

2. 接通电源

插上电源，打开电源开关，通过亮度调整旋钮调整照明亮度。

3. 置片

将植物组织永久切片标本放置在压片夹内，通过推进器水平或垂直移动载物台，将标本移至载物台通光孔中心。

4. 标本聚焦

将 $\times 10$ 物镜放入光路，先通过转动粗调旋钮将载物台上升到最高处，然后通过目镜一边观察标本一边缓慢反方向转动粗调旋钮，直至视野中能观察到较为清晰的物像，再通过细微转动细调旋钮以获得清晰的物像。在用目镜观察时，可水平方向向外或向内拉动目镜镜筒，使目镜两中心距离和观察者的瞳距一致。通过旋转目镜上的屈光度调节环，可调节并补偿观察者左右眼的视力差异。

5. 亮度调节

当使用低倍镜观察时，如视野太亮，可通过减小光源亮度或降低聚光镜或缩小孔径光阑进行调整。使用高倍镜时，通常视野会变暗，此时则通过增加光源亮度或上升聚光镜或放大孔径光阑进行调整。

6. 观察

将需要使用的物镜放入光路进行观察。从低倍镜转换到高倍镜时，视野图像会变得模糊，此时只需略微转动细调旋钮即可获得清晰的图像。此时，可根据需要，按上述方法再次对亮度进行调节。

7. 油镜的使用

可使用油镜观察标本的细微结构。

先分别使用低倍镜和高倍镜确定需要观察的部位，再换油镜进行细微观察。使用油镜前，先将载物台降低约 1.5 cm，再在盖玻片上滴加一滴专用镜油，通过物镜转盘将油镜转至工作位置，观察者从一侧观察，缓慢上升载物台，使油镜与油滴刚好接触。观察者再通过目镜细微转动细调旋钮进行调焦。此时，应注意不要转动粗调旋钮，以免损坏镜头。如盖玻片太厚不能聚焦时，应更换。更换后，重复上述步骤



重新调焦。

每次使用油镜完毕后，应立即清洁油镜镜头，以免显微镜油残留在镜头上，损坏镜头。清洁方法是载物台下降，使用擦镜纸蘸取少许无水乙醇，或乙醚和无水乙醇混合液（7：3），将镜头上残留的油渍擦去。

8. 归整

观察结束后，先通过粗调旋钮下降载物台到最低位置，移除玻片，然后通过物镜转盘将物镜 $\times 4$ 对着通光孔。最后，通过亮度调整旋钮将光源亮度转到最小值，并关闭电源，从电源插座上拔出电源线。

还镜前，应检查显微镜有无损伤或是否干净。如目镜、物镜或聚光镜上发现污物，可用擦镜纸蘸取少许无水乙醇进行清洁。其余部位，可用纱布擦拭干净。如发现损伤，应立即上报。

9. 还镜

右手握住搬运把手，左手托住镜座，将显微镜小心、平稳地放置在镜柜中，并套上显微镜罩。

三、使用显微镜的注意事项

显微镜是精密光学仪器，使用时应避免撞击，规范操作。

1. 使用显微镜时，应轻拿轻放，防止振动影响光学系统导致光轴偏离而影响成像光路。
2. 不可随意拆卸显微镜的各个零部件，以免造成故障。
3. 使用显微镜时，应熟悉其构造和使用方法，严格按照操作规程使用。
4. 使用高倍镜观察时，应注意先用低倍镜观察和调焦，再换高倍镜观察，观察时，缓慢转动细调旋钮以获得清晰的图像，请勿转动粗调旋钮，以免压碎玻片损伤镜头。
5. 观察临时装片时，必须加盖玻片，并且用滤纸吸干盖玻片四周和载玻片下面的液体，不能让物镜镜头黏附液体。如有液体黏附，请立即使用擦镜纸擦拭干净。
6. 使用油镜后，应立即清洁镜头，以免镜油残留损坏镜头。使用擦镜纸擦拭时，应沿同一个方向擦拭，避免来回反复擦拭，以防损伤镜头。
7. 使用和保管显微镜，应注意防尘、防潮、防高温和防震动。应配套使用防尘罩，并在镜柜中放置干燥剂。



第二节 植物组织临时装片的制作

对植物细胞、组织或器官进行显微观察时，常需使用植物的玻片标本进行观察。玻片标本应薄且透明，若不透明，使用光学显微镜观察时光线就不能通过被观察的材料。可通过切片法、撕剥法、涂片法、压片法等获得标本，并可制备成植物组织永久切片或临时装片。制作临时装片具有简便、快速的优点，是植物组织形态实验观察中需掌握的核心技能。

一、临时装片的制作方法

临时装片是指将实验材料不经染色或简单染色后，直接放置在载玻片上的水滴中，加盖盖玻片后在短时间内进行观察的标本装片。此方法不需要复杂的设备，具有简便、快速、可立即观察、染色时间短等优点，尤其是可以直观地观察到样本内的自然结构与天然颜色。

此方法主要包括如下步骤（图 1-3）。

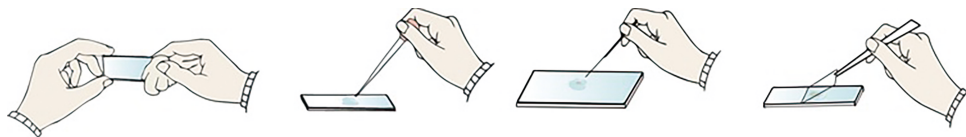


图 1-3 临时装片的制作方法

1. 准备载玻片和盖玻片

用清水将载玻片和盖玻片清洗干净，再用吸水纸或干净的纱布分别将载玻片和盖玻片的两面擦拭干净。用左手拇指和食指夹持玻片边缘，右手拇指和食指拿吸水纸或纱布上下均匀用力地擦拭。盖玻片很薄，擦拭时用力要轻，以免将盖玻片捏破伤手。

2. 滴清水或染色液

将载玻片平放在实验台上，用滴管在载玻片中央滴入 2 ~ 3 滴清水或染色液。

3. 放置材料

用镊子或解剖针挑取已准备好的样本材料，并将其尽快放置在载玻片上的水滴或染色液中，以保持材料的新鲜，可使用镊子或解剖针将材料尽量展平或分散均匀。注意避免产生气泡。



4. 加盖玻片

用镊子夹取盖玻片一侧，使盖玻片另一侧与水滴边缘相接触，由左向右缓慢放下盖玻片，以防产生气泡，直到放平为止，并用滤纸将盖玻片四周多余的液体吸干。如液体未布满盖玻片，说明水滴或染色液过少，可用滴管吸取液体从盖玻片左侧缝隙处少量补加。用滤纸吸取多余液体时，应注意缓慢吸取并避免触碰盖玻片，避免液体流速过大而使材料皱折或堆叠。如载玻片上滴加的液体为染色液，染色 3 ~ 5 min 后再观察。

5. 镜下观察

将制作好的装片置于光学显微镜下观察。

二、徒手切片法制作临时装片

切片的制作方法有多种，如徒手切片法、石蜡切片法、冷冻切片法等。徒手切片法是一种最简单且快速的切片制作方法，是生物学组织形态观察中最常使用的方法。此方法是指手持刀片将新鲜或固定的实验材料切成薄片的制作方法，主要适用于软硬适度的植物根、茎、叶等材料。但由于是人为徒手操作，不易得到薄而完整的切片，需要反复多次练习。徒手切片的步骤如下。

1. 取材

根据观察目标，切取一段长约 2 cm、外部形态良好、软硬适中的新鲜材料，材料切面应平整。若材料过软，则将其夹入支持物（如胡萝卜、萝卜、马铃薯块茎等）中，或将材料卷成筒状进行切片。

2. 切片

切片前，刀面和材料切面均需沾上少许清水，以减少刀面与材料之间的摩擦力，且有利于切片黏附在刀面上。

切片时，左手拇指、食指和中指夹住材料，拇指略低于食指，且拇指不能弯曲，材料高出食指约 2 mm。右手持双面刀片的右下方，并将刀片放在左手食指上，刀口向内并与材料切面保持平行，且刀口自外侧左前方向朝内侧右后方水平拉刀。切片时，只用右手臂力，勿用腕力及握刀关节的力量，左手保持平稳不动。动作要迅速、敏捷，一次成形，不要反复来回拉切。如此连续切片 2 ~ 3 片，切下的薄片用湿毛笔或者解剖针将其轻轻移入培养皿的清水中。

3. 装片

在干净的载玻片中央滴入 2 ~ 3 滴清水，用镊子从上述培养皿中选取最薄且透明、完整的切片放在清水中，加盖玻片制成临时装片。



4. 观察

将制好的临时装片置于光学显微镜下观察。

三、撕剥法制作临时装片

撕剥法是用镊子轻轻撕取薄而均匀的植物材料制作成样品标本，一般用于观察植物表皮细胞、表皮附属物或气孔等。

用刀片在待观察植物的叶片或鳞叶表面划一个约 $5\text{ mm} \times 5\text{ mm}$ 的“井”字，或斜向对折叶片，然后用镊子挑起表皮一角并迅速撕取部分表皮，按上述装片步骤将表皮尽快放入清水或其他所需液体中并展平，将制作完成的临时装片置于光学显微镜下观察。

四、涂片法制作临时装片

涂片法是用解剖针或刀片在植物材料上轻轻刮取样品，或者使用解剖针将刮取的样品均匀涂抹在滴有清水或其他需要液体的载玻片中进行观察，此方法适合于马铃薯块茎、梨果肉、番茄果肉等材料的细胞观察。

在样品制备时，应注意涂层要薄，避免细胞堆积或分布不均。

五、压片法制作临时装片

压片法是将植物组织置于滴有清水或其他所需液体的载玻片上，盖上盖玻片，然后用镊子或铅笔尾部施加一定的压力，将组织细胞压散后置于光学显微镜下观察的方法。此方法适用于观察植物幼嫩器官中的细胞分裂情况，如植物根尖、花粉、花药等。

在样品制备时，应注意操作手法，避免过度施压而破坏植物组织结构或压碎盖玻片。

第三节 植物绘图方法

在没有显微拍摄技术的年代，徒手绘图是向外界展示镜下结构的唯一方法。随着科技的发展，显微拍摄技术已较多地融入显微观察中。然而，在植物形态解剖学的学习和研究中，掌握徒手植物绘图方法不仅有利于训练观察力、提高组织辨识准确率，同时有利于捕捉细节，发现在拍摄过程中因景深或染色不均匀易被忽略的微观特征。



植物绘图就是以绘图形式，科学、准确地将显微镜下所观察到的内容记录下来，因此，植物绘图具有严格的要求和方法。

一、植物绘图的要求

1. 应具有高度的科学性、准确性

首先，观察者需耐心、细致、严肃地观察材料，充分了解所绘材料的结构排列、特征及比例。然后，选取结构完整、有代表性的部位进行绘图。绘图时，应客观、真实地反映材料的真实性，注意区分正常结构和偶然结构。

2. 绘图要合理布局、清晰整洁

绘图前应对页面进行科学规划，合理布局，力求页面整齐。在每个图所布局的范围内，图应画在稍偏左侧位置，图中各部分结构的图注放在右侧。绘图及图注一律使用铅笔，不可使用钢笔、圆珠笔或其他有色笔。

3. 绘图比例应正确、美观

应按植物各部分结构的原有比例绘制，均匀放大或缩小，切忌对构图中的局部进行放大或缩小。

4. 点、线应清晰流畅

应使用线条和点进行构图。线条主要用于勾画轮廓和结构。植物绘图不可使用涂抹阴影或用小斜线的方法表示明暗，而是用圆点的疏密变化表示明暗和深浅。

5. 需突出主要特征

经反复观察后，应重点描绘植物的主要形态特征，其他部分可仅绘出轮廓，以表示其完整性。

6. 标注要准确

结合理论知识，认真辨认植物各部分结构，对绘图进行清晰而准确的标注。

二、植物绘图的步骤

1. 准备绘图工具

绘图纸或实验报告纸、HB 或 2H 或 3H 铅笔、直尺、橡皮擦。

2. 构图

根据实验要求，选出完整且有代表性的植物结构进行绘图。设计好所绘图片在整个页面的整体布局、图形大小和位置。绘图的位置一般安排在绘图纸的偏左位置，并预留左侧装订位置，右侧和下方位置写图注和图题。结构简单的图一般占页面 $1/4 \sim 1/3$ ，结构复杂的图一般可占页面 $1/2 \sim 2/3$ 。如果所画为植物细胞结构图，画



2 ~ 3 个细胞即可；如果所画为植物器官结构图，画 1/8 ~ 1/2 局部即可。

3. 绘图

先绘草图再绘成图。先用铅笔在绘图纸上描绘出整体的图形轮廓，注意观察轮廓和实际观察图像的大小和位置比例是否相符，安排好各部分的比例和联系。先绘轮廓，再绘细节，用点、线条边观察边绘图。线条要一笔画出，粗细均匀，光滑清晰，接头处无分叉和重线条痕迹。可用粗线或双线表示厚的细胞壁，细线表示薄的细胞壁。用点的疏密表示明暗和深浅，点要圆而整齐，大小均匀。

4. 标注

绘图完毕后，要用引线和文字标注各部分结构的名称。用水平直线在图的右侧引出标注，引线应间隔均匀，线的右侧末端应在同一垂直线上，标注应整齐一致。标注内容较多时，可用折线，不可用弧线、箭头线、交叉线等作标注。图题写在图的下方，同时，需要用括号标注放大倍数，放大倍数为目镜放大倍数 × 物镜放大倍数。