

# 植物胚胎学实验技术

主 编 李桂琴

副主编 王丽娟

吴秀菊

东北农业大学

## 前言

《植物胚胎学实验技术》是东北农业大学植物教研室为研究生和生命科学学院学生学习《植物胚胎学》课程，为了提高学生动手能力，进行实验和科学研究用的指导性教材和参考书。本教材是在 1990 年桂明珠教授编写的《植物胚胎学实验及其研究法》教材的基础上，由李桂琴、桂明珠两位同志在总结多年来的教学实践经验，广泛搜集近期国内外有关著作和文献资料，进一步加以修改、补充而成的，在 1997 年第二次印刷。

《植物胚胎学实验技术》内容全面，大体包括两大部份：第一部份是植物胚胎学的研究技术方法。其中又分为，花粉发育制片法、花粉生活力测定、花粉粒萌发与花粉管生长、花药与绒毡层整体制片法、胚囊整体解剖制片法、植物胚胎学中荧光技术、植物胚胎学中的组化分析、石蜡切片与半薄切片、植物胚胎学中的电镜技术、显微摄影与放射自显术以及组织培养等十一项，计 64 条；第二部份是配合植物胚胎学的课堂教学编排的植物胚胎学实验指导。共安排六个实验，其中有二个实验为综合性、设计性实验。注重学生创新能力的培养，优化了实验内容，有助于提高学生的综合素质和创新意识。在取材上，除选用植物胚胎学经典材料外，大部分是作者多年来的科研材料、供学生巩固所学知识，并进一步深化、研究基本理论。

本教材内容选择上力求全面，每一技术方法注意文字简单易懂同时，尽量保持原作的本来面目；有常规的技术方法，也有最新的实验技术和最新成就，具有较强的实用性和新颖性。因此，该教材不仅适于学生学习之用，而且一些技术方法也可为从事细胞生物学、植物解剖学等多学科的科技人员、教师参考。

在我们即将完成这本教材的时候，我们谨向被选用文献的各位专家、作者，表示最诚挚的谢意！由于水平有限，无论在内容的取舍、编纂等各方面肯定会有不少缺点或错误，敬请读者批评指正。

编者 2004 年 6 月

# 目录

一、植物胚胎学研究方法.....	(1)
(一) 花粉发育制片方法.....	
(二) 花粉生活力测定方法...	
(三) 花粉萌发与花粉管生长的观察法...	
(四) 花药与毡绒层整体制片方法.....	
(五) 胚囊等整体制片方法.....	
(六) 植物胚胎学荧光技术.....	
(七) 植物胚胎学的石蜡切片与半薄切片	
(八) 显微摄影术与放射自显术.....	
(九) 植物胚胎学的组化分析.....	
(十) 植物胚胎学的电镜技术.....	
(十一) 组织培养方法.....	
二、植物胚胎学实验指导.....	
实验一 植物界的有性生殖与世代交替...	
实验二 小孢子发生与雄配子体发育.....	
实验三 大孢子发生与雌配子体发育.....	
实验四 受精作用及胚和胚乳的发育.....	
实验五 花器官的离体培养.....	
实验六 胚状体的发生.....	
.....	
主要参考文献.....	

# 一、植物胚胎学研究方法

## (一)花粉发育制片方法

### 1. 分离花粉母细胞和花粉粒制片

(1)固定：选发育合适花药，用卡尔诺氏固定液(纯酒精 30 毫升，冰醋酸 5 毫升，氯仿 15 毫升)固定时间 2~4 小时，然后用纯酒精泡洗至无醋酸气味为止。

(2)下行至水：酒精浓度为 95%、80%、70%、50%、30%、水，材料在各级酒精中约 10 分钟。

(3)水解：材料入 1NHCL 中 58~62℃ 一般为 4~35 分钟有时可达 25 分钟，因材料大小而异。减数分裂期的玉米花药，山丹花粉等 8 分钟为宜。

(4)水洗：蒸馏水洗 2~3 次。

(5)挤压：水洗后将材料放入盛数毫升蒸馏水的小研钵内，用研钵钵锤挤压，使花药中花粉母细胞尽量挤出来。

(6)过滤：用 50 号筛底或适合的尼龙布过滤，除去大块花药组织，将滤液纳入离心管内、此滤液中含有丰富的花母细胞或花粉粒。

(7)离心：将离心管放入离心机内离心 2 分钟，用吸管吸去清液。

(8)染色：将锡夫试剂 1-2 毫升注入具有沉淀材料的离心管内，用玻棒搅拌，使其混合均匀。

锡夫试剂配方：主要按郎利(1952)拟定的方法。

称取碱性品红和焦性亚硫酸钠各 0.5 克溶于 100 毫升 0.15N 盐酸中，在 2—3 小时期间不断振荡，然后加入 0.3 克活性炭，振荡 5-8 分钟，并用粗滤纸过滤。获得的滤液应该是透明无色，如不符合要求，再重复上述过程一次。然后往过滤后没有完全褪色的混合液内

再加 0.15 毫克焦性亚硫酸钠，静置 5-6 小时后，可变成无色的合格标准液。

(9)水洗：染色后将离心管放入离心机中离心，去上清液→加 2—3 毫升蒸馏水，搅拌后置数分钟，离去上清液。

(10)漂洗：向离心管内注入 2% 的亚硫酸氢钠溶液 1—2 毫升，迅速用玻璃棒搅拌，并立即离心移去上清液。分色时间尽量控制得短些为好。

(11)水洗：分色后迅速加蒸馏水 1—2 毫升，搅拌 5 分钟，离去上清液。

(12)脱水透明：上行酒精浓度为 30%、50%、70%、80%、95%、100%、1/2 纯酒十 1/2 二甲苯、二甲苯，每次换液为 8 分钟左右。

(13)分装：脱水透明至二甲苯离心后除去上清液但要留一点，然后用 1 毫升移液管把悬浮液吸出来，立即分置于预先准备好的清洁载片上，并迅速在每载片上滴一滴树胶，并敏捷盖上盖片。

### 2. 减数分裂制片法

#### (1)制片过程

①取适宜的材料，按临时制片、染色压片 ②放置干燥或微火烤干 ③经 1 / 2 冰醋酸 / 1 / 2 正丁醇，至盖片脱落为止 ④经正丁醇 I ----->-纯正丁醇 II ——>纯正丁醇 III ⑤加拿大树胶封藏。

(2)固定：卡尔诺(3: 1)固定 12—24 小时后，保存在 70%酒精中。

(3)媒染和“醛”处理

①媒染：保存液中加入若干滴醋酸铁液作媒染(加后保存液为浅桔色)1—3 天。可提高核仁和染色质的着色能力，增加与细胞质的反差。

醋酸铁配法：45%醋酸加入少量的氢氧化铁(氯化亚铁或硫酸高铁铵亦可)。初配时溶液为淡黄色。

必须搁置一段时间等变深红色再用。

②“醛”处理：花粉开始积累淀粉后，淀粉被染成深的颜色，而营养核和生殖核(或精子)完全埋在淀粉中无法看到，为此 Rupert A. E 醋酸洋红加水合三氯乙醛，就可清除干扰。

### 3. 减数分裂材料的染色与压片

植物材料的减数分裂压片，均可用醋酸洋红染色。较难染色的材料，可选用石炭酸品红染色液和醋酸一铁矾苏木精染色液，也可用醋酸地衣红染色。

一般材料经固定 1—2 小时后立即染色和压片，效果比较好。

压片时，可用镊子直接从固定液中取出材料，置于滤纸上，吸去多余的固定液，再将花药转移到洁净的载片上，加一小滴染色液，用镊子或刀片截断花药，并用镊子轻轻挤压花药，使花粉母细胞从切口逸出。然后用镊子把药壁残渣拣除干净，这是压片优劣的关键之一。为此，配备一把弹性较好而尖细的不锈钢镊子是非常必要的。如不除净药壁残渣，则不容易把分裂的细胞压平，这不仅染色体难以分散，而且在以后制作永久制片时，细胞还会在脱水过程中从片子上大量脱落。

加盖片后，再在盖片四周稍加染色液，然后在酒精灯上微烤(醋酸苏木精和地衣红可不加热)，以不热沸为度。稍停片刻，在盖片上加一滤纸片，压片。

一般减数分裂的压片，无需敲压盖片，以免引起染色体的混乱和结构的破坏。而尤其是第二次分裂时期，甚至于重压都会导致二或四分体细胞的分离，破坏其完整性。但如细胞比较小和染色体也很小的材料，也可适当进行敲击和重压。

总之，减数分裂过程中的第一次分裂以计数和观察单个染色体的形态和行为为主，一般需要重压。而第二次分裂则需保持细胞的完整性，一般宜轻压。

永久封片的制作和一般体细胞压片法相同。

### 4. 花粉粒整体封藏法

在胚胎学上建立花粉外部形态的一般概念是必要的。例如花粉的大小和形状。具萌发孔或萌发沟，外壁光滑的或具刺或其它的纹饰等等。可用简单的甘油胶(glycerin jelly)法制备几种有代表性的花粉粒整体封固片。以进行比较观察。

(1)材料的准备：选用形态各异的花粉。如菊科的、锦葵科的、石竹科的、百合科的和禾本科的花粉，以及杜鹃或合欢等的复花粉。用刚开放的花，从自由开裂的花药取花粉操作方便；也可在花期收集花粉，将其贮存于 4℃的冰箱中备用。

(2)配制甘油胶：将 5 克明胶溶于 30 毫升蒸馏水中，待溶解后加入 35 毫升甘油，0.5—1 克酚，加热至约 30℃并搅拌。待充分溶解后，加少量甲基绿染料，以混合液呈深的

海蓝色合适。

### (3)制片方法

①在洁净的载玻片上滴一滴 30%或 50%酒精，然后放上少量花粉。如果是刚开裂的花药，可直接将花粉抖落下来。注意花粉撒落均匀，不宜过多，避免聚集成团。载片放在烤片台上微热(40-45℃)至酒精蒸发，花粉在酒精中可除去空气和油脂。

②将预先配制好的甘油胶放在温箱中或水浴中使溶化。然后滴加花粉上，盖上盖玻片封住。甘油胶不宜过量，否则加盖片时溢至外面，影响封固。在甘油胶中常加入一些甲基绿(methyl green)，材料可在此封固剂中慢慢染上颜色。制片在室温放置 2-4 天后变得稍干，此时可用各种封漆沿盖片周围封固。用专门的转台用于圆盖片的涂封。

### 5. 花粉萌发孔检查及制片法

作物育种或栽培实践中，常常需要对花粉萌发孔数目的鉴定，花粉萌发孔数目比较少的(如禾本科作物花粉只有 1 个，油菜、大豆等为 3 个)容易检查确定，有些作物如西葫芦、黑穗醋栗、甜菜等花粉粒萌发孔为多数，有时随倍性变化而变化，这样给准确计算花粉萌发孔数目带来困难。作者在甜菜花粉发育过程中，曾利用 Ertman 乙醚解方法处理，检查花粉萌发孔，得到较满意效果。具体方法如下：

#### (1)试剂配制：

取乙酸酐 9 份，浓硫酸 1 份混合即成，配制时注意先量取乙酸酐后，再取一定比例的浓硫酸，并徐徐加入到乙酸酐内，避免操之过急使溶液溅出而烧坏皮肤衣物等。

#### (2)材料处理：

①取预先备好的花药，放入盛乙酸酐、浓硫酸混合液的试管中；

②将试管放入盛水的烧杯中加热水浴至沸腾为止。试管继续在沸水中停留 7—8 分钟，使材料由无色变为褐色；

③小心倾出处理液，用蒸馏水洗数次直至洗净为止。操作时用细的移液管进行。

#### (3)制片方法

将上述解离好材料，吸一滴于载片上，用吸水纸吸去多余水分，并在烤片台上微热(40—45℃)至水分蒸发；将预先配好的甘油胶放温箱或水浴中使期熔化，然后滴加在花粉上，加上盖片封臧，制片在室温下稍干后，可用封漆将盖片周围封住。

欲制永久制，脱水、透明等步骤可用离心机离心方法更换溶液，最后封臧在加拿大树胶中。

(4)镜检计数：将制好的制片置显微镜下观察，可清晰地看到花粉壁的轮廓和壁上多个透亮的萌发孔。为准确数出花粉萌发孔数量观察时可随时调节显微镜焦距数出整个花粉各表面的萌发孔。

除利用抗乙醚解方法外，还可以根据萌发孔处物质某一时期具明显的 PAS 反应特点，来测定萌发孔的数目。

## (二)花粉生活力的测定方法

采集的花粉和经贮藏的花粉，在使用之前必需作生活力的测定以鉴定其质量。测定花粉生活力的方法主要有三种，即离体萌发、活体萌发和用氧化还原染料染色的非萌发

分析测定法。

### 1. 花粉粒的自然萌发

以水稻为例，取花序插于盛水瓶中，置于室内，待开花约 10 分钟-20 分钟后，分次从开过的小花中，镊取雌蕊，置于载玻片上。加 1-2 滴乳酚棉兰液(A 液：棉兰 0. 1g，蒸馏水 100cc；B 液：乳酸 20%，甘油 40%，酚 20%，蒸馏水 20%；取 A 液 5cc+B 液 100cc 应用)，轻轻盖上盖玻片。静置 10-15 分钟，用 40%甘油浸洗数次后，镜检。花粉粒及其花粉管被染成鲜兰色，柱头与花柱组织无色。

### 2. 离体萌发测定法

(1)材料：根据地区和季节采集新鲜的花粉或实际应用中保存的花粉。

(2)花粉培养基制备：离体萌发测定花粉生活力要得到正确的结果，必需提供花粉萌发的最适的条件。主要是营养培养基和温度条件。各种植物一般在 25℃左右都是合适的。但培养基的要求不同植物有所不同。在测定某种植物的生活力时，如无记载资料可参考时，需进行一系列的预备实验，确定一种合适的培养基。

Brewbaker 和 Kwack(1953)提供了一个认为许多植物合适的培养基，配方如下：

#### A、无机盐基液

HB0 <sub>3</sub>	0. 1 克
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O	0. 3 克
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0. 2 克
KN0 <sub>3</sub>	0. 1 克
蒸馏水	100 毫升

#### B、应用时的培养基

溶液 A	1 毫升
蔗 糖	1 克
蒸馏水	9 毫升

蔗糖的浓度大多数植物以 10% 合适。不同植物浓度一般变动于 0. 5% 至 20% 之间，现举例如下：

#### 例 1 金鱼草花粉萌发培养基

30%蔗糖	38 毫升
0. 1%硼酸	2 毫升
0. 1%氯化钙	10 毫升

#### 例 2 烟草

10%蔗糖 100 毫升中加 1-2 滴 0. 1%硼酸。

#### 例 3 百合

10%蔗糖	100 毫升
0. 1%硼酸	2 毫升

### (3)萌发试验操作方法

①悬滴法 在方形盖玻片上滴一滴花粉培养液，均匀地将花粉撒落在液滴上，然后将盖玻片反转。置于预先准备好的小室上。放在 25-28℃的条件下，经一定时间在显微镜下观察萌发结果，这种方法适于作微量花粉生活力的测定。

②穴滴法 预先准备一个多穴的装置。在一个培养皿中加人一片多穴的载玻片作为

一个培养室，或是用一个培养皿灌入石蜡造成多凹坑的培养室。

在穴内加入供花粉萌发的培养基，撒上花粉；在培养皿的盖的内面加一块湿的滤纸，然后将培养皿盖上。这样的萌发装置同样需要放置在对花粉萌发合适的温度条件下，在一定培养室内可同时进行多种花粉样品的比较试验或是作培养基成份对萌发影响的比较试验，本实验中用一种植物的花粉试验培养液中蔗糖浓度不同对萌发的效果。

③琼脂法 在液体的花粉萌发培养基中加入琼脂或明胶。浓度在 0.5-1%，倒入培养皿中做成固体的平板。将花粉撒在上面萌发。琼脂法为花粉萌发提供更好的氧气条件，同时可萌发大量的花粉。玉米的花粉在液体培养基很难萌发，在上述配方制作的固体培养基上，萌发率可达 90%。

#### (4)萌发率的计算

经一定时间取出花粉萌发装置，在显微镜下观察花粉萌发的情况，许多植物花粉在合适的条件下，约半小时即开始萌发，3-4 小时达到最高萌发率。以花粉管的长度大于花粉粒的直径作为萌发花粉的标准。计数一个视野中花粉的总数和萌发花粉数，按下式计算萌发率。

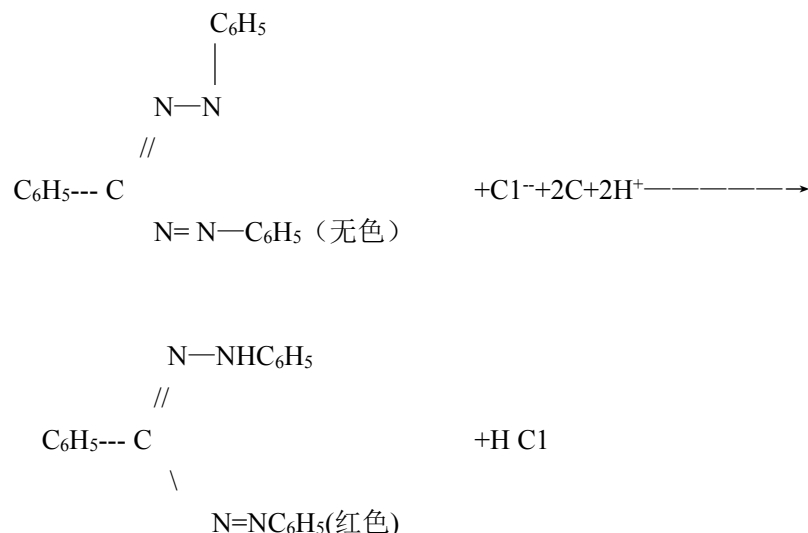
$$\text{萌发率} = \frac{\text{已萌发的花粉粒数目}}{\text{花粉总数}} \times 100\%$$

从计算几个视野所得的平均数，可得到较准确的数字。

### 3. 四氮唑染色法

氯化三苯四氮唑，即红四氮唑，作为非萌发分析花粉生活力的方法，速度快也比较精确的反映花粉的生活力，而且染料容易获得（北京化工厂有出品）。

(1)原理：红四氮唑是标准的氧化还原色素，水溶液无色，遇到活细胞里的脱氢酶接受氢离子，还原后变红生成不溶于水的三苯甲脂，呈红色。反应式如下：



(2)红四氮唑溶液的配制：用 0.2MpH7.2 的磷酸缓冲液配制成 1% 的红四氮唑溶液，并加入一定量的蔗糖，蔗糖的浓度参考所试验的植物花粉离体萌发的培养基的浓度。

(3)操作步骤：取一块带圆坑的载玻片，在坑内注入红四氮唑溶液(不要太满)，用毛笔将花粉撒在溶液上面。将此载玻片置于铺有湿滤纸的培养皿内，然后放入 37-40℃ 的



温箱中，一定时间(30-60 分)后取出载玻片在显微镜下观察。在一个视野中计数花粉的总数和有生活力的（红色）花粉数。

(4) 计算：

$$\text{有生活力花粉百分率} = \frac{\text{变红色的花粉数目}}{\text{花粉总数}} \times 100\%$$

### (三)花粉萌发与花粉管生长的观察方法

#### 1. 萌发花粉与花粉管染色

- (1) 材料：金鱼草属、芥属、月见草属、萝卜属、蔷薇属、茄属和万寿菊属把柱头上萌发的花粉粒和生长在这些植物雌蕊组织中的花粉管等的切片。
- (2) 固定：卡尔诺（乙醇：醋酸=3：1）固定 1 小时。
- (3) 水解：在 60℃ 的温度下，在 45% 醋酸中水解 5-60 分钟（时间随种类不同而定）。
- (4) 染色：先将雌蕊放在双筒解剖镜下切开，并放在载玻片上加数滴染料染色 5-15 分钟。

染色剂配方：

番红-0	150 毫克
苯胺兰	20 毫克
45%醋酸(热的)	21 毫克

注意：苯胺兰有沉淀作用，故每次应用时应过滤，室温下可保持数星期。

#### 2. 分离花粉管制片

在人工条件下培养花粉产生花粉管。如果是纯糖液作培养基可收集在离心管内即可离心，除去上清液用固定液固定；如在明胶或琼脂的培养基内萌发出的花粉管，必须经过 50℃ 温水洗 3—5 次把胶洗掉，每次都要离心分离后固定。

为防止花粉管收缩，在固定液中加入一定量的糖，是固定液渗透压与花粉管内的平衡。染色、脱水过程如分离花粉相同，但应注意花粉管易交织在一起，分装前应将其分开再行处理。

#### 3. 检查花粉在柱头上萌发和花粉管在花柱中生长制片法

在受精作用的研究中和杂交育种工作中，有时需要了解在传粉后柱头上花粉萌发的状况。花粉管在花柱中生长的行为；计算在传粉后花柱中生长的花粉管数目和测定花粉的生活力。为了这样的目的。需要制备传粉后柱头和花柱的制片。

花柱头上或花柱中生长的花粉管。可应用某些染色剂对花粉管的选择染色或用荧光技术显示。这里介绍几种供光学显微镜检查花粉管的染色制片法和用苯胺蓝染色用于荧光显微镜下检查花粉管的方法。

##### (1)材料的准备

无论是一般的检查花粉管的染色法或是荧光法都用同样的方法准备实验材料，以小麦为例，开花时进行人工传粉。在传粉后一定时间采集柱头和花柱或整个雌蕊。固定和保存在固定液中，小麦在传粉后约 1 小时固定柱头，可获得满意的效果。取材的时间是

以该种植物从传粉至花粉萌发、花粉管在花柱中正在生长的时间范围为依据；固定液用福尔马林—醋酸—酒精(FAA)，固定 24 小时，可长期保存；或用卡诺氏固定液固定，时间约 1 小时再转移到 70%酒精中保存。

固定的材料在进行下一步处理之前(软化或直接染色)要经过各级酒精过渡到蒸馏水中。

## (2)软化

纤细的柱头和花柱(如禾本科植物)直接染色即可观察，粗大的柱头和花柱在染色之前需要进行软化处理，使组织能被压成薄层，以利在显微镜下检查花粉管。

软化柱头和花柱常用碱性溶液，下列几种方法在一些植物中试验过，有良好效果。

①材料置于 10%的无水亚硫酸钠(sodium sulfite)中，放在高压灭菌锅中，在 15 磅，120℃处理 10-20 分钟(蓼)。

②在上述溶液中，放在沸水浴中处理 10-20 分钟(棉花)。

③材料置于 5NNaOH 溶液中处理 5 小时(菠菜)。

④材料置于 8NNaOH 溶液中处理 12 小时(文殊兰)。

⑤材料置于 1NNaOH 溶液中处理 1 小时(白菜)。

⑥材料置于 1N 盐酸，在 56℃处理 15 分钟(甘蔗)。

## (3)在普通光学显微镜下检查花粉管的染色制片法

①用棉兰—乳酸—酚染色液染色

染色剂配制：

棉蓝(cotton blue) 0.8 克

(即苯胺蓝 aniline blue)

乳酸 25 毫升

酚 25 克

甘油 25 毫升

传粉后的柱头和花柱加一滴棉兰—乳酸—酚染色液静置几分钟，加盖片后即可在显微镜下观察。此液使花粉管染成蓝色，而柱头和花柱组织无色或淡蓝色。用于检查水稻；小麦、大麦等柱头上萌发的花粉管效果很好。制片用 40-50%甘油封片可增加透明度，也能暂时保存一段时间。

②用间苯二酚蓝—马休黄染色液染色

染色剂配制：间苯二酚蓝(lacmoid)(即树脂蓝 resorcin blue)10 毫克用少量 95%酒精溶解加 10 毫升蒸馏水，再加入 10 毫克马休黄(martins yellow) (即萘酚黄 naphtol yellows)。待溶解后用氨水调至 pH3 左右。

用此染色液可使花粉管染成橄榄绿色，而柱头和花柱组织无色或淡黄色。用于检查棉花柱头上萌发的花粉和花柱中的花粉管效果很好。花柱先用刀片剖成两半。放在 3NNaOH 中处理 4-5 小时或在 10%无水亚硫酸钠中置于沸水浴中处理 10 分钟便软化，然后，取出放在载玻片上，加一大滴染色液浸液。10-20 分钟后用滤纸吸去染色液，经碱性水(pH=8)洗后，加上盖玻片观察。

③用蕃纤—苯胺蓝染色液染色

染色液配制：

苯胺蓝(aniline blue) 0.75 克

番红 O (safranin O)            0. 25 克  
45%醋酸                        100 毫升

曾用此染色甘蔗花柱中的花粉管，花柱先在 1N 盐酸中处理 15 分钟，经蒸馏水洗后用上述染色液染色，染色时间约需 20 分钟。染色后材料用 45%醋酸清洗 1 小时，即可封片

观察。如用乳酸-酚溶液封片则更加清晰。花粉管呈深蓝色，背景是非常浅的紫色。

乳酸酚溶液配方：

酚(石炭酸)     10 克  
蒸馏水         10 毫升  
乳酸            10 毫升  
甘油            10 毫升，

#### 4. I—KI 染色法

(1)染液配制：先溶 1. 5 克碘化钾于 100 毫升蒸馏水中，待全溶后加 0. 5 克碘。

(2)检查方法：先将花柱切下放置于载片上，加一滴碘素碘化钾液，静置数分钟，加盖盖片在显微镜下观察。可见柱头、花柱及败育花粉染成黄色；而生活力的花粉及花粉管被染成兰紫色。

此法适于花柱、柱头小而透明，花粉富含淀粉的(如小麦等)材料。

#### 5. 树脂兰染色法

(1) 本法适于大型柱头和花柱。首先切下花柱并纵切成二半放指形管中，固定 12-----24 小时，(醋酸 1 份，福尔马林 1 份，30%酒精 3 份)。

(2) 加水：用 50%酒精浸 10 分钟后换蒸馏水。

(3) 入 8NNaOH 水溶液中，室温下 4—5 小时(如放入湿箱 45℃，需 0. 5—1 小时)→自来水换数次→1%盐酸水溶液静置 10 分钟→反复换水漂洗，直至材料变成白色透明为止。

(4) 染色： 材料换至 1%碳酸氧钠的 5%酒精溶液中，室温下处理 1 小时以上，然后转入 0. 5%树脂兰的 30%酒精液中染 1 小时以上。

(5) 最后用 1%碳酸氢钠的 30%酒精溶液洗 1—2 次转入水中。

(6) 观察时，将材料取出置载玻片上，加 1 滴水，盖上盖片，稍微加压使花柱平展后即可在显微镜下观察。

结果：通过上述处理可清晰看到：花柱组织细胞几乎透明无色， 只有花粉管被染成兰色。

#### 6. 花粉管在雌蕊中的染色方法（一）

花粉粒在柱头上萌发后，花粉管进入花柱并不断向下延伸，欲观察花粉管的动态必须借助于染色方法，使材料更清晰，特别是某些作物花柱带有色素时，要借助于特殊方法，使花柱褪色，花粉管着色，以便观察。此方法适于禾本科具羽毛状柱头类型如高粱、小麦等。利用改良的 Nebis 法。具体操作如下：

(1) 开花前 1-2 天去雄，套袋隔离。

(2) 授粉：将去雄后 0. 5 小时、2 小时、4 小时、8 小时及 24 小时分别授粉， 并做好记录。

(3) 固定：将授粉后 1、2、4、8、24 小时的穗上用镊子轻轻将雌蕊连用子房取下，

立即放 F、A、A 液中固定(小麦 0.5 小时即可)。

(4) 漂白: 5%次氯酸钠水溶液处理 1 小时, 加 20%水溶液用几种雌蕊试验 10 分钟即很好, 或用氯酸钾(1%)水溶液处理小麦 20 分钟亦可。

(5) 水洗: 2 分钟。

(6) 染色: 用 1%树脂酚兰水溶液染 5—10 分钟。

(7) 蒸馏水洗涤, 至除去浮色为止。如经验不足, 可在显微镜下边退色边检查。如观察材料在雌蕊内看不清, 可稍加 1%树脂酚兰, 加上盖片。稍加压力进行观察。

结果: 这样染色材料可看到花粉在柱头萌发直到胚囊前的全部过程。花粉管被染成兰色, 而雌蕊组织几乎无色。

#### 7. 花粉管在雌蕊中的染色方法(二)

此法适于双子叶植物, 如茄属、油菜、萝卜、蔷薇属及月见草属等植物的花粉和花粉管在雌蕊中生长情况, 具体方法如下:

(1) 开花前去雄, 套袋、7 天后授粉。

(2) 固定: 将授粉后一天的花朵, 把雌蕊取下固定卡尔诺液中, 1 小时内即可, 蕃茄固定 10 分钟。

(3) 软化、透明: 将材料放入 60℃热醋酸内, 浸 5—60 分钟(小白菜需 10 分钟)。此时雌蕊呈透明状或由绿→黄绿→无色。且十分柔软。

(4) 染色: 将材料轻轻夹起放置载片上, 滴加 45%醋酸液防止干燥。用解剖针轻轻剥开花柱部分组织(必要时在解剖镜下操作), 然后加 1—2 滴番红苯胺兰染液。

(5) 压片: 加盖片并适当加压即可观察, 花粉粒被染成兰色, 花粉管被染成鲜艳紫色, 柱头、花柱呈浅红色, 染色过程很快只有 1 分钟左右。

① 染液配制: 将番红 O(或 T)150 毫克与苯胺兰(aniline blue)25 毫克溶于 25 的 45%热醋酸内过滤制成, 番红、苯胺兰染液在常温条件下可保存几周;

② 用 45%醋酸洗涤后材料, 在冷凉条件下, 可在 45%醋酸内保存只少一周之久。

#### 8. 传粉后柱头的整体制片

禾本科植物柱头细胞少而透明, 染色后可直接观察, 染色可用醋酸洋红或苯酚—乳酸—甘油—棉兰, 亦可用孚尔根试剂染色, 以水稻雌蕊为例, 步骤如下:

(1) 将水稻雌蕊拨在载片上, 并滴几滴棉兰溶液(配方: 乳酸: 苯酚: 甘油: 蒸馏水: 棉兰=25: 25: 25: 25: 0.3)盖上盖玻片。

(2) 在盖片的一侧滴少许 40%的甘油, 在另侧用滤纸将染料吸出, 如此反复几次, 直至盖玻片下面全部为甘油溶液浸入时, 即可在显微镜下观察。

结果: 花粉管为兰色, 而柱头组织无色或呈淡兰色, 花粉管在柱头组织中非常清晰。如时间过长, 全部变兰时就不易观察。

用醋酸洋红染色时, 需在酒精灯上微微加热, 以加深染色程度, 去掉多余染料即可观察。

用孚尔根试剂染色时, 与一般孚尔根染色相同, 但在水解时, 除在 1NHCl, 60±1℃, 处理 10—15 分钟外, 也可用 5NHCl 在室温中水解 1 小时, 如再用醋酸洋红或固绿复染则更为清楚。

(3) 如制作永久制片, 染色后可经酒精脱水—樟油或二甲苯透明后, 再用加拿大树胶封藏。

#### 9、异源花粉与柱头亲和力制片方法

研究远缘杂交时,常取异源花粉和柱头制片观察花粉在柱头上是否萌发?花粉管在柱头内生长速度以及花粉管中的物质(包括精子及花粉内含物)运动情况。才能知道父母本的亲和力,从而有目的的选配亲本,获得远缘杂种。

(1) 花粉在柱头上萌发情况的观察方法:

① 乳酚棉兰染色剂配制:

I 液: 1%棉兰水溶液

水溶性棉兰.....0.1 克

蒸馏水.....10 毫升

II 液: 乳酚甘油液

乳酸.....20%

酚(石炭酸) .....20%

甘油 .....40%

蒸馏水.....20%

III液: 乳酚棉兰染液

I 液.....5 毫升

II 液.....100 毫升

②操作步骤

以小麦为例,将授过异源花粉柱头的穗子取下,插入水瓶中,而后用镊子把子房取出置于载片上,切下柱头滴 12 滴III液,1—2 分钟后,用甘油洗去多余棉兰染液,然后滴上 1 滴甲醛甘油合剂(1 / 3 甘油 + 2 / 3 甲醛),紧紧压片后用加拿大树胶或透明树脂在盖片四周封片。

(2) 精子发生鉴定

①醋酸洋红配制

取 45%醋酸 100 毫升,加入 1—2 克洋红,煮沸后用铁丁放入几十秒钟,冷后过滤,直至此液变暗红色而不发生沉淀为止。

②操作步骤:

a 取雌蕊切下柱头于载片上,然后滴上 1—2 滴醋酸洋红液,染 1—2 分钟后,在酒精灯上加热,防止煮沸,然后用 45%的醋酸置换,滴一滴 45%醋酸盖上盖片,压紧后即可观察。

b 如做半永久制片:用吸水纸吸去样品上的醋酸,再滴一滴甲醛甘油合剂,盖上盖片,压紧后用加拿大树胶封片。

水稻染色时,需将柱头滴上醋酸洋红后,放置 10—15 分钟,再制片这样色彩较好,此法亦可用于花粉发芽的观察。

### (四)花药与绒毡层整体制片方法

#### 1. 花药的整体制片法

在花药培养的单倍体育种等工作中,需要一种简便有效的制片方法来观察判断各种

诱导条件下对花粉雄核发育影响。朱自清(1987)介绍一种制作花药整体永久封方法，克服了醋酸洋红难制成永久制片和石蜡切片手续繁杂和难观察花粉全貌的缺点。具体方法如下：

(1) 材料：禾本科植物如小麦、大麦、黑麦、小黑麦等花药体积小、药壁薄特别适于整体制片；烟草、曼陀罗等大而厚的花药可进行整体染色透明，而不宜整体装片。但可在透明浸胶后剖开花药挤出花粉，再行封片。一般培养 5—12 天花药正是雄核发育的花粉进行细胞分裂的高峰。

(2) 固定：用卡尔诺(3: 1)固定液，固定 1—2 小时。

(3) 下行至水，经 90%、80%、70%、50% 酒精下行至水、或下行至 70% 酒精中保存。

(4) 孚尔根染色：花药置冷的 1NHCl 中，室温下 20 分钟→换入 60℃ 1NHCl 恒温水浴中水解 12 分钟→换入席夫试剂中染色 12 小时(最好在 10℃ 恒温) →漂洗液漂洗三遍每次 1 小时→流水冲洗 20 分钟。

(5) 脱水、复染和透明：经 50%、70%、80% 90%、95% 酒精逐级脱水至无水酒精三遍(每次约 30 分钟) →不复染，或在 1 / 2 酒精+1 / 2 二甲苯的饱和亮绿溶液 (溶解度很小，溶液很稀)复染 5—10 分钟，注意复染颜色可不太深。再用上液分色 20 分钟→纯二甲苯浸二遍，每次 10--20 分钟→把材料放至凹玻片上，挑选多细胞花粉的花药。

(6) 浸胶和封片：将材料换入稀的加拿大树胶中，将指管放在 35℃ 温箱，放 1-2 天，使二甲苯逐渐蒸发，直至树胶适度粘稠，取花药于载玻片上进行封藏，并放入 35℃ 温箱烘干。

附：试剂配方：

(1) 1NHCl：取 82.5 毫升纯盐酸加水稀释至 1000 毫升。

(2) 席夫试剂：称 1 克碱性品红溶于 100 毫升的煮沸蒸馏水中，搅拌，冷至 50℃ 时过滤到一有色玻瓶中，并加入 10 毫升 1NHCl 和 1 克偏重亚硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )摇匀后，盖紧瓶塞放黑暗处，经 18 小时后即可应用。染色液应为淡茶色或无色。

(3) 漂洗液：1N 盐酸 15 毫升，10% 偏重亚硫酸钠水溶液 10 毫升，再加蒸馏水 100 毫升。

## 2. 绒毡层膜的分离与整体制

(1) 原理：腺质绒毡层细胞的内切向面普遍存在一层抗乙酰解的膜。即绒毡层膜(tapetal membrane)。这种结构坚固的膜在花药的石蜡切片中是分辨不清的。应用 Ertman 乙酰解方法处理花药。可以获得包围花粉粒的整个绒毡层膜的囊和显示分布在膜的内表面(向药室一面)的乌氏体(Ubisch body)。分离的材料可供电子显微镜及光学显微镜分析的样品，分离和制片步骤如下。

(2) 材料的准备：禾本科植物的花药如小麦、黑麦都是作为分离绒毡层膜的好材料。

自小孢子时期至成熟花粉时期的花药都可用于分离绒毡层膜，发育较早期的花药容易获得完整的包含花粉粒的囊状绒毡层膜。接近开花时的花药。当进行分离处理时，囊很容易破裂，这有利于取出绒毡层膜片段，制成展开的单层膜的制片。对观察其表面的细微结构效果好。花药可用卡诺氏(Carnoy)固定液或福尔马林—醋酸—酒精(FAA)固定液固定，用前经 70% 酒精清洗一次。也可以直接用新鲜材料分离。

(3) 分离 经固定的花药在 70%酒精中洗一次，置于试管中，加入醋酸酐和浓硫酸(9: 1)混合液(配制时注意将浓硫酸逐滴加入)。

## (五)胚囊等整体解剖制片法

### 1. 胚囊整体解剖制片法

先将固定好的胚珠在双筒解剖镜下用解剖针剖开珠被，取出胚囊，在凹玻片中脱水、透明和封藏。但制片时应注意要点如下：

(1)解剖胚囊时首先要弄清胚囊在胚珠中的位置，因此，解剖时先用较大材料确定位置后再解剖幼小材料。

(2)取出胚囊后，胚囊外边有一层透明的薄膜，(即大孢子囊壁)这层膜易染杂质和折皱，最好细心将其除去。

(3)用尖端微细滴管换液，换液时动作要轻而慢，否则会损伤或丢失材料，为防止易碎、多而杂的缺点，改进做法是：

①在载片上先滴一滴加拿大树胶：

②用解剖针针尖蘸一滴加拿大胶，并在酒精灯火焰上稍加热，然后在解剖镜下用带胶的针尖挑起所需材料，同时用另一针尖协助轻轻往上卷。

③将针尖上的材料轻轻地放入载玻片上的加拿大胶上，同时借助另一解剖针将材料推至加拿大胶中，摆好位置盖上盖片。

### 2. 整体解剖法研究玉米的胚胎发育

赵世绪(1975 年)用玉米自交系 HY× 3811 的单交种作材料。进行控制受粉。授粉后分别于 24 小时、36 小时、48 小时、72 小时用 Bouin-Sass 固定液固定果穗中部的子房。选用 Bouin-Sass 固定液是因为其中的苦味酸能把胚囊染成黄色，易于与周围的珠心组织区别开来。

解剖方法：将玉米子房自固定液中取出，用保险刀在背面正中间纵切，深度在 1/3 左右，然后放在载片上，加一滴 50%酒精，在解剖镜下用细的解剖针，将子房的两半部小心撑开，即可看到胚囊位于两半子房中的一面上。如解剖新鲜材料则在载玻片上放一滴蒸馏水，将子房两半撑开后，在珠心组织上加一滴醋酸洋红，即可区分出胚囊与珠心组织，胚囊着色比珠心组织深。

封片：将幼小胚囊用针挑出后，加醋酸洋红，再经脱水透明后，用加拿大树胶封藏。

用上述方法可观察胚的发育、胚乳的发育和反足细胞群的发育。

### 3. 被子植物胚囊酶解分离法

周嫦(1981)用烟草、蚕豆与紫菜苔为材料进行酶法分离胚囊，步骤如下：

#### (1)固定

选择适宜的新鲜花蕾，取出雌蕊剥去子房壁，将胚珠固定于 FPA(配方为福尔马林 5 毫升，丙酸 5 毫升，50%乙醇 90 毫升)中 20—24 小时，换入 70%乙醇，贮存于 4℃冰箱中备用。

#### (2)酶解

将贮存的胚珠经 50%、30%乙醇下行至蒸馏水，水洗数次，最好过夜，彻底脱去乙

醇。用果胶酶与纤维素酶的混合液进行酶解。酶液浓度因材料而宜：烟草用 1.5% 果胶酸加 1.5% 纤维素酶，蚕豆与紫菜苔用 2.5%-3% 果胶酸与 2.5%—3% 的纤维素酶，在微型混合器 CMM—1 型，江苏省南通县电子分析仪器厂制的微型多孔板的小孔中加入酶液，取胚珠至酶液中，在 28-30℃ 保温条件下连续振动约 5 小时，以便促使酶解速度均匀并加速其进程。取一滴酶液在显微镜下检查酶解程度，至大部分胚珠组织离散呈悬浮状态。

### (3) 水洗与透明

将含材料的酶液转入离心管，加蒸馏水稀释，在微型离心机中以 1500 转 / 分的速率离心约 5 分钟，略加静置，用吸管吸去上清液，再换水离心 1-2 次。弃去上清液，加入乳酚甘油(乳酸 20 毫升、酚 20 毫升、甘油 40 毫升、蒸馏水 20 毫升)，离心弃去乳酚甘油上清液，滴入适量新的乳酚甘油，使材料密集。

### (4) 制片与显微观察

吸 1 滴含悬浮材料的乳酚甘油，置清洁的载玻片上，加上盖片，用 OLYMPUS VANOX 多用显微镜 Nomarski 干涉差装置或相差装置进行观察与摄影。

## 4. 用酶解压片法分离胚囊

### (1) 取材

李乐工(1985)以颠茄等五种材料取花和花蕾。

### (2) 固定

用酶解压片的材料可用 FPA, FAA 或 Carnoy 氏固定液，从花蕾中取出子房，剥去子房壁，胚珠连同胎座放入固定液中，常温中固定 24 小时，然后转移到 70% 乙醇中保存，在 4℃ 中备用。

### (3) 酶解

固定材料转入酶解液前，经 50%、30% 乙醇至蒸馏水，每级 30 分钟，在蒸馏水中换 2 次，用崩溃酶(Drisdase)，其配制方法：先将酶和用无离子水配成 2% 的水溶液，在 3000 转 / 分，离心 10 分钟，去掉沉淀物，pH 调至 5.5 后，倒入一培养皿中备用，取出蒸馏水中的固定材料，在解剖镜下剥下胚珠，去掉胎座，将其放入含有酶液的培养皿中，在 28℃ 下进行酶解，时间 3-6 小时。一般来说，酶解 4 小时对大多数固定材料的胚珠是合适的。

### (4) 制片观察

酶解后的胚珠，制片时稍加压力，细胞可很好分散。将含有材料的酶液加蒸馏水稀释，并转移至离心管中，在 500 转 / 分条件下，离心 3 分钟，去掉上清液，加蒸馏水后再离心一次，即可收集用于压片，制片时吸少量含有胚珠的液体滴在载片中央，加盖片后，用解剖针在盖片上轻轻敲打，使珠被和珠心细胞离散而分离出胚囊。制好的片子可用蜡或打字修改液封边制成半永久的片子。

制片在 Olympus BH—2 型显微镜的相差装置下进行观察，可根据大孢子母细胞、二分体、四分体及各个发育时期的胚囊的固有形态特点观察寻找对象。

## 5. 胚的解剖及整体制片

准备用于解剖胚的材料同样将其转移到 50% 或 70% 酒精中。

(1) 解剖 方法如前面所述。解剖胚时先要认清楚胚在胚珠中所处的位置，特别留心在剖开的胚囊的珠孔端去寻找胚，对解剖出的球形胚、心形胚和鱼雷形胚是完全可能的，



幼小的球形胚时期在棉花可以做到连同胚乳囊一起解剖出来，对胚珠较小的植物取出幼原胚是比较困难的。分离的幼胚用针取出置于盛有 50%酒精的小培养皿中。

解剖出的球形、心形或鱼雷形胚在溶液里自由转动。不经染色在解剖镜下就能看清楚其外部形态。如果需要永久保存，也可经染色、脱水等步骤制成长久制片；太大的胚不宜制作永久封片。

(2)胚囊体制片程序 多种染色液可用于胚的整体染色。这里介绍用稀的代氏苏木精(Delafield hematoxylin)和孚尔根(Feulgen)反应作为一般染色法。

① 用稀释代氏苏木精染色法——材料至蒸馏水→在稀释的代氏苏木精(原液加等量蒸馏水)染色液中染 2—4 小时(视胚体大小而定)→自来水中清洗(更换 2—3 次)→0.1%盐酸分色至合适的深度→自来水中清洗几次→碱性水(水中加几滴氨水)中使染色变蓝→经蒸馏水及各级酒精脱水→经 1/2 纯酒精+1/2 二甲苯过渡二甲苯中清净透明→树脂封固。

脱水至透明各步骤停留 20—30 分钟，视材料大小而定，以达到脱水清净和透明为准。因为一个整体的胚比较厚，封固时为了不压裂胚体，要用浓厚的树胶封固，必要时在载玻片上按盖玻片大小的范围在四个角垫上一小块碎玻璃(可用碎盖片)。

如果胚体细胞中内容物很浓厚时，在染色前可用碱液予处理以增加透明度。方法是 将胚置于 5%的氢氧化钠的 50%酒精溶液中，在约 40℃的条件下处理几小时，至用自来水漂洗干净后变成白色为止。

②用孚尔根染色法——用孚尔根核反应法使核染上紫红色，再用一种酸性染料使细胞质染色，胚细胞能清晰显示。染色步骤是：材料至蒸馏水→在 4NHCl 中在 28℃水解 1.5—2 小时→转换至 1NHCl 盐酸中洗一次→在锡夫(schiff)试剂中染 6 小时→漂洗液中漂洗 30 分钟至 1 小时(更换 3-6 次)→自来水洗 10—15 分钟→经蒸馏水至各级酒精脱水→用固绿或桔红 G 复染→经 1/2 纯酒精+1/2 二甲苯过渡到纯二甲苯中透明→树脂封固。应当注意下列几点：

a.水解条件用一般的 1NHCl，60℃处理 10 分钟效果是一样的。本实验改用 4NHCl，28℃的条件，在温度和时间上更好控制；

b.在锡夫试剂反应后，转移到漂洗液中时务必检查反应是否正确，即核是否染色；

c.复染宜染，因为一个整体结构，颜色深了影响清晰度。

试 剂 配 制

a 萨斯一波因固定液

A 液： 1%铬酸 50 毫升

B 液： 10%醋酸 20 毫升

福尔马林 10 毫升

饱和苦味酸 20 毫升

用时 A 液与 B 液等量混合。固定时间为 12-48 小时，也可长时间保存。

b 0.5 苏木精水溶液

苏木精溶液需经“成熟”(氧化)变成苏木精素才能应用。最好将苏木精溶解于纯酒精作成 10%的基液，用时再稀释到 0.5%。

c 代氏苏木精

A 液：苏木精 1 克

纯酒精

60 毫升

B 液：硫酸铝铵溶于 100 毫升的蒸馏水，使成饱和液。

将 A 液慢慢滴入 B 液中，滴时用玻璃棒轻轻搅动，使均匀，装入广口瓶中并用细纱布封口。配成的混合液放在光线充足，空气流通的地方。经一星期后氧化的溶液用滤纸过滤。在滤液中加入 25 毫升的甘油及 25 毫升的甲醇。再经一至两月才能应用，如急需应用可加入少量过氧化氢。

#### 6. 胚乳解剖及整体制片

(1)材料的准备：为观察一定发育时期的胚乳，最好人工进行授粉，便于采集到合适时期的材料，采来的花可将胚珠从子房内取出，保存在固定液中备用，有时也可固定子房，例如小麦。

多种固定液可用于固定胚珠，常用福尔马林—醋酸—酒精(FAA)、那瓦兴(Navashin)以及鲍英—萨斯(Bouin-Sass)固定液，鲍英—萨斯固定液中有苦味酸的成份，固定后的胚囊带黄色，便于解剖时辨认各种结构，所以更常采用这种固定液。

(2)解剖：准备解剖的胚珠从固定液取出后换至 50%或 70%酒精中，然后将胚珠置于载玻片上，加一滴 50%酒精，在双筒解剖镜下进行解剖。左手用镊子夹住胚珠，右手拿解剖针将胚珠轻轻划破。剖开胚珠取出囊状的胚乳。取出的胚乳囊一般在其外面有一层薄的大孢子壁，应当小心地剥去，否则染色后不洁净，影响清晰度。

为了使胚乳铺平成一层，用针将囊状的胚乳纵向剖开（很小的胚乳不必剖开），用针挑起片状的胚乳放入盛 50%或 70%酒精的小培养皿中（直径 4 厘米）。更换几次酒精以洗去固定液，对用鲍英—萨斯固定液保存的材料，在酒精中清洗直至组织变白或稍带黄色，否则影响染色。

(3)染色：胚乳小块直接在染色液中染色或将其先粘贴在载玻片上然后染色，粘贴后染色的制片远不如直接染色后作整体封固的清晰。

粘贴胚乳与粘贴石蜡切片的蜡带相似，在洁净的载玻片上涂一薄层明胶粘剂(Haupt氏粘剂)，加一滴 3%福尔马林溶液。然后将胚乳块转移至其上，并尽量使材料铺平。再用吸水纸将水液吸去。在烤片台上(45℃)干燥，需充分干燥才能染色，否则材料掉落。可置 37℃温箱中过夜。

染色可选用海德汉氏苏木精(Heidenhain hema[okylin]或其稀释染色步骤如下：

①用海德汉氏苏木精染色——材料至蒸馏水→4%铁矾中媒染 20 分钟→蒸馏水中洗净(更换 3 次)→0.5%苏木精中染色 15—20 分钟→蒸馏水中清洗(更换 2—3 次)→饱和苦味酸(或 2%铁矾)中分色→自来水清洗(更换 3-4 次，要彻底洗净，水洗至最后一次量中加数滴氨水，使染色变蓝，颜色更为美观)→蒸馏水经 30%→50%→70%→95%→100%(2 次)酒精脱水，每级约 10 分钟，纯酒精一级可延长至 30 分钟，原则上达到水分脱净→经 1/2 纯酒精+1/2 二甲苯过液至二甲苯中透明，每级 10—15 分钟→加拿大树胶封固。

苏木精主要将胚乳组织的核染成蓝黑色。细胞质可染成浅蓝色。在脱水至 95%或纯酒精时可用固绿复染，细胞质呈蓝绿色，更为鲜艳。固绿配成 0.5%的 95%酒精溶液或配成 5%的 1/3 纯酒精+1/3 二甲苯+1/3 丁香油液，染色后在 1/2 纯酒精+1/2 二甲苯略为分色。

将胚乳块直接进行染包脱水时，在封固要注意将材料铺平。可先在载玻片上滴

上树胶，材料置于其上使展平。此时材料易碎，操作要轻。

②用稀释海德汉氏苏木精染色——材料至蒸馏水→2%铁矾中媒染 30 分钟→蒸馏水洗(更换 3 次)→稀释的苏木精(约 1/2, 5000)中染 15 分钟或更长，染色经一定时间后经常在显微镜下检查，至染色深度合适，不再进行一般的分化，其余步骤与上述相同。

#### 7. 观察植物胚胎发育的简便方法

观察植物胚胎发育过程通常采用切片法、胚珠水解压片法、整体解剖法、酶分离法和整体透明等几种方法，其中切片法制作过程复杂；用胚珠水解压片法时，胚珠的其它细胞会覆盖在胚囊上难以观察；整体解剖法的操作要求精细难度较大，酶分离法不能保证所需要的胚珠或子房通过酶解得到其中的胚囊；相比之下整体透明是比较好的方法，但在相差和一般干涉显微镜下只能观察早期的胚囊，如用染色处理，由于子房和胚珠大小不均一，染色时间难以掌握，而且胚囊以外的组织也会着色，影响胚囊内部结构的清晰度，在此我们介绍一种整体透明直接在微分干涉差显微镜下观察作物胚胎发育过程，此方法比较简单、方便，易掌握。

以双子叶植物甜椒(农大选系)从子房中取胚珠和单子叶植物水稻(粳稻 461 品系)子房为材料，分别取开花当天和开花后 1、2、3、4、5、天的材料，用 95%乙醇和醋酸(3:1)固定 24 小时后，换 70%乙醇保存。材料用 95%乙醇脱水 10 分钟，再用 100%乙醇脱水 2 次，每次 10 分钟，最后一次过液，换水杨酸甲酯和 100%乙醇混合液(1:1)透明一小时以上，用水杨酸甲酯透明 3 次，每次 1 小时以上，最后一次放置 24 小时以上，将材料放入含有水杨酸甲酯的凹玻片中(由于早期甜椒胚珠体积微小，需在 olympus 解剖镜下一一的取出)在 olympus 微分干涉差显微镜下观察。

因微分干涉差显微镜对焦距要求很严格，不在一个平面上的物体就看小到，调焦后，可分别看到胚囊内部结构，受精后形成的早期原胚、球形原胚及开始分化的胚。

## (六)植物胚胎学荧光技术

### 1. 花粉发育的荧光观察法

(1)取材、固定、切片前过程按常规进行。

(2)染色：用含有 0.01%水溶性苯胺兰的 1/5M 的磷酸缓冲液(pH3.2)染色 20 分钟以上。

(3)观察：紫外光激发、激发滤片 U 和栅滤片 L435 结合使用，结果胼胝质可呈现出黄绿色荧光。其荧光强弱表明胼胝质含量的多少。

(4)应用：此法可用小孢子母细胞进行减数分裂过程中，观察胼胝质壁的动态变化；也可用于花粉管在花柱中伸长的情况。

(5)花粉发育中不经苯胺兰染色的切片进行荧光观察时,发现自四分体后期一成熟花粉暗绿色荧光逐渐增强推断孢粉外壁的逐渐积累。

### 2. 花粉管在花柱中生长荧光显示法

材料在染色前处理和树脂兰染色法的步骤与方法(1)的(1)一(3)步骤完全一样。

经充分水洗后，直接转入 0.005%的水溶性苯胺兰和 0.1M 磷酸氢二钾水溶液中

染色 2—12 小时，时间宜长不宜短。

染色后，取出材料置载玻片上，轻轻加压使其干展，即可放荧光显微镜或专用荧光灯下观察。花粉管显示出异常明亮的浅兰色荧光。

上述介绍的第二种方法所用的染料和处理方法都是对胼胝质专门染色法。由于花粉管在花柱中生长时，花粉管后面会不断形成含胼胝质的栓塞，所以被染成显示特殊的荧光，用此法是可十分精确的显示胼胝质物质的。

第二方法基本与德增智、加藤正弘、矢野文香(1974)采用的方法相似(详见(日)<育种>24(6): 269~276)，岩崎文雄、林武(1979)又进行改良将原来固定，NaOH 处理及染色时间各自为 1 小时是可能的(详见日<农业技术>34 卷第 3 号 1979.8:363)

### 3. 用苯胺蓝压片法观察小孢子和雄配子体发育中胼胝质的动态

李师翁、屠骊珠等用白刺(*Nitraria Sibirica*)和知母(*Anemrrhena asphodeloides*)为材料，于开花前取不同发育时期的花蕾用卡诺或 FAA 固定液固定。卡诺固定 24 小时后转入 70%酒精置于冰箱中。

制片及观察步骤为：a. 将材料下降至蒸馏水中，于解剖镜下剥出花药，在 0. 2mol 盐酸 60℃解离 20 分钟，或 1mol 盐酸室温解离 20 分钟，蒸馏水彻底洗净；b. 用下面方法染色以确定固定时花药的发育时期：卡宝品红整染 1 小时<sup>[4]</sup>；0. 1%醋酸洋红整染 1 小时。上述两种方法染色后用 45%冰醋酸分色，最后用水彻底洗净。爱氏苏木精整染 24 小时，用蒸馏水洗数次，再用自来水冲洗至返蓝<sup>[1]</sup>。

经上述处理并染色后的材料，可转入 70%酒精置冰箱保存数周，对胼胝质无显著影响。

取染色后的花药，置载片上，加两滴 0. 01% 苯胺蓝溶液(为 1 / 15mol 磷酸缓冲液配制)，加盖片并轻压盖片使花药的细胞分散。用力要轻而匀，以免使胼胝质壁与细胞分离。压好的片子如不及时观察可用 50%甘油封片，置冰箱可保存一周；在 NIKON 研究显微镜明场和荧光系统下对照观察并照相。用紫外光(UV)激发，EX330-380，DM400，BA420；所有对照均以未经处理的花药用蒸馏水压片，荧光系统观察同上。

### 4. 在荧光显微镜下检查花粉管的苯胺蓝染色制片法

水溶性苯胺蓝配成脱色(碱性)溶液，染料可与花粉管壁胼胝质结合，在 356nm 左右波长的紫外光下呈现亮的黄绿色荧光，使花粉管呈现在黑的背景上，十分清楚，这种制片检查花粉管效果比一般的染色法好，方法也简单，但实验室要有荧光显微镜设备。实验室应用上海科学仪器厂生产的 72 型轻便荧光光源也可满足要求。

①配制脱色苯胺蓝溶液下列几种配方都曾被应用过：

苯胺蓝	100 毫克
0. 1MK <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	100 毫升
苯胺蓝	5 毫克
0. 15MK <sub>4</sub> HP0 <sub>4</sub>	100 毫升
pH 调至 8. 2 或 9—10	
苯胺蓝	50 毫克
0. 05MNaH <sub>2</sub> P0 <sub>4</sub>	100 毫升

上述几种配制法刚配成时溶液颜色较深，需放置数小时至 12 小时待染色液变清后应用。

## (七)石蜡切片与半薄切片

### 1. 石蜡 连续切片法

植物胚胎学大小孢子发生，雌雄配子体发育受精作用，胚和胚乳发育等方面的研究，目前绝大多数仍以光学显微镜观察，石蜡切片方法制片。植物胚胎学工作者，必须熟练地掌握这种方法。现结合胚胎学研究的一些特点，以苏木精整染方法为例，将其一般操作过程简单介绍于下：

(1)取材：根据研究目的和对象按时、准确地进行取样。并尽量将外边的鳞片或花被等部分清除干净。并注意材料的典型性及代表性。

(2)固定：取样后应立即将取好的材料放入卡尔诺(3: 1)固定液固定，时间为3—24小时依材料而定，但最多不超过24小时，固定后用70%酒精冲洗。并保存在70%酒精中。

#### (3)整染：

①由70%酒精换至50%酒精中(2-4小时)；

②2%丙酸(用50%酒精配制)媒染48小时；

③再以2%丙酸，爱氏苏木精(2: 1)染液整染3天左右。镜检染色程度：即取一材料置载片上切碎，滴一滴10%甘油水液，要求细胞核染成紫色，细胞质无色，核仁清楚为适度。如染色较浅可适当延长染色时间。

④染色合适后，用自来水换洗数次，最后一次浸2小时，至没有颜色褪出为止。

⑤兰化：用自来水冲洗24小时，使核呈兰色。

(4)脱水：30%、50%、70%、80%、95%、100%酒精每级1—2小时。

(5)透明：2 / 3 纯酒精+1 / 3 二甲苯→1 / 2 纯酒精+1 / 2 二甲苯→1 / 3 纯酒精+2 / 3 二甲苯→二甲苯，每级1-2小时。

(6)浸蜡与包埋：按常规方法进行。

(7)切片：注意确定好部位后进行连续切片，并将切成蜡带按顺序放置。即切片要成蜡带，并保持平直、整齐。

(8)裱片：最好用“捞片法”。

①将切好的蜡带，按顺序小心地放在37—40℃的恒温水面上，使其蜡带自由伸展(必要时可向水中加数滴冰醋酸)。

②待蜡带展平后，取一干净的载片，在一面均匀涂上粘贴剂，然后从蜡带一端插入水中，并将一段蜡带轻轻拖出，贴于载片上。

③经镜检材料合适后，用解剖刀将蜡带分段按顺序摆正位置，除去多余水分，放入37℃~40℃温箱内干燥。

(9)封片：粘好的切片干燥后，放入盛二甲苯的染色缸内去蜡(10分钟左右即可)。取出载片经擦拭后用加拿大树胶封片，

爱氏苏木精配制方法

苏木精            2 克

冰醋酸            10c. c

甘 油                100c. c

95%酒精            100c. c

混合后，将瓶口用2—3层纱布扎好，置暗处，经3个月（染液颜色转红）左右成熟后方可使用。

## 2. 快速处理仪应用

为缩短石蜡切片的制片周期。兰州大学生物系创制‘T SQKC—III型生物制片快速处理仪。应用此仪器可大大缩短时间。以蚕豆7-9mm子房、大葱2-3mm子房材料用FAA固定，爱氏苏木精整染方法其步骤和时间如下：

在处理仪中：由下午3时-10时爱氏苏木精染色(30℃)，次日上午8时→9时，蒸馏水浸洗浮色，自来水兰化等。

在处理仪中：上午9H寸开始脱水→中午1时30分包埋结束。即15%→35%→50%→70%→80%→95%→100%→100%酒精(以上各5分钟)→1/5氯仿→2/5→3/5→4/5→5/5氯仿(每级各10分钟)→1/2氯仿+1/2石蜡→1/3氯仿+2/3石蜡(各15分钟)→纯蜡I→纯蜡II→纯蜡III(各20分钟)→包埋。

切片以后各步可按常规方法进行。

## 3. 植物胚胎学中石蜡切片的整体染色法

王蔚魁(1981)在观察小麦和玉米受精及胚胎发育中摸索出三种整体染色法：

(1)醋酸—水合氯醛—铁矾苏木精染色

①染液配制和使用：

A液：

将2克苏木精溶于100毫升45%冰醋酸的贮备液；

B液：

取0.5克铁矾溶于100毫升45%冰醋酸贮备液。

A、B两液分别贮备，使用前一天将A、B两液等量混合，然后每5毫升中溶入2克水合氯醛，即为染液。以配制后2—14天新鲜液为好。

在染色过程中不需媒染和分色，整染时间为12—24小时，但持续染3--4天也无妨。

②染色与制片

a 材料按需要选择固定液，经固定后置70%酒精中保存备用。

b 用蒸馏水浸洗后浸1NHCl中20分钟，然后在60℃1NHCl中水解8—10分钟。

c 蒸馏水浸洗2小时后，在醋酸—水合氯醛—铁矾苏木精中染色12—24小时。

d 用水稍加冲洗后按常规石蜡法脱水制片。

一般不需复染，如需复染时，整体材料在脱水过程中用95%酒精或III级浓度的正丁醇脱水剂(蒸馏水15份、乙醇50份、正丁醇35份)配成的0.1%桔红G溶液，脱水兼复染2—3小时。

(2)孚尔根反应

①按常规方法配制试剂

②染色与制片

a 材料经固定后置70%酒精中保存；

b 解离：经蒸馏水后浸于1NHCl中20分钟，再移到60℃的1NHCl中水解8—10分钟，经蒸馏水浸洗2小时；

- c 染色水洗后用席夫试剂染色 3 小时以上;
- d 漂洗: 用漂洗液换液漂洗 10 小时左右;
- e 按常规石蜡制片法制片;
- f 脱水过程中可用固绿复染, 即用 95% 酒精或Ⅲ级浓度的正丁醇脱水剂, 配成 0.1% 的固绿溶液, 脱水兼复染 2-3 小时。

### (3) 高碘酸-席夫(PAS)反应

①试剂配制: 将 0.25 克高碘酸钾溶于 100 毫升 0.15% 的硝酸中, 配成高碘酸钾氧化剂。其它试剂按常规法配制。

#### ②染色与制片

- a 材料固定后于 70% 酒精保存备用;
- b 经水洗后在高碘酸钾氧化剂中氧化 70—100 分钟。
- c 自来水冲洗后, 蒸馏水浸洗数小时;
- d 席夫试剂中染色 3 小时以上。
- e 用漂洗液漂洗 10 小时左右。
- f 若需复染, 先经蒸馏水浸洗 2 小时, 再入醋酸-水合氯醛-铁矾苏木精染色数小时。
- g 稍加洗涤后按常规石蜡切片制片。

## 4. 植物胚胎学中的整体透明技术

### (1) 胚珠的“4<sup>1</sup>/2”透明技术。

#### ①“4<sup>1</sup>/2”透明剂及其改良配方

a “4<sup>1</sup>/2”透明剂: 由乳酸(85%)、水合三氯乙醛、酚、丁香油、二甲苯五种透明剂按 2: 2: 2: 2: 1 的重量比配合而成, 故简称“4<sup>1</sup>/2”。配制时须按上述顺序依次混合。混匀后在加塞玻璃瓶中可久贮。

b “1KI-4<sup>1</sup>/2”透明剂: 将碘 100mg、碘化钾 500mg 溶于“4<sup>1</sup>/2”9g 中配合而成, 用以增强反差, 并显示组织中的淀粉粒。

c “PP-4<sup>1</sup>/2”透明剂: 将高锰酸钾 3mg 溶于“4<sup>1</sup>/2”1g 中, 用以增强反差。此剂需临时配制。

d “BB-4<sup>1</sup>/2”透明剂: 将苯酸苄酸(benzyl benzoate)1g 溶于“4<sup>1</sup>/2”9g 中, 用以增强反差。

e “PPBB-4<sup>1</sup>/2”透明剂: 将高锰酸钾 3mg 溶入“BB-4<sup>1</sup>/2”1g 中。高锰酸钾须临用前加入。

#### ②制样与观察程序

胚珠固定于 FPA 中, 保存于 70% 乙醇(低温)中→直接转入或经 95% 乙醇稍加脱水后转入“4<sup>1</sup>/2”或其改良配方中透明 24 小时或更长时间→将胚珠连同透明剂转到特制的 Rajslide(载片)上, 加盖玻片封藏; 也可用普通载玻片, 但最好在盖玻片四隅下加垫盖玻片碎片, 以免将胚珠压散→在相差或干涉差显微镜下, 通过调焦观察胚囊的不同光学切面。

#### ③预处理

可在透明前采取各种预处理方法:

- a 在 85% 乳酸中室温泡 4 天, 或 50℃ 下 24 小时, 再转入透明剂(smith, 1973)。

b 在 10%KOH 中处理 2 分钟, 水洗 4 次, 脱水至 95%乙醇后, 再转入透明剂(Smith)。

c 用 4%淀粉转葡萄糖苷酶(amyloglucosidase 溶于 pH4.5 的 0.1mol / l、醋酸盐缓冲液中)在 35℃下处理 3 小时, 以除去胚珠中的淀粉。水洗后, 用 Stockwell 液(水 90ml、重铬酸钾 1g、铬酸 1 g、冰醋酸 10ml)在室温下处理 20 小时, 以除去组织中的鞣酸。水洗数次去掉黄色, 再转入透明剂(Kenrick 等, 1986)。

## (2)胚珠的冬青油透明技术

### ①冬青油透明程序

胚珠或幼小子房固定于 FPA 中, 保存于 70%乙醇(低温)中→95%、100%乙醇彻脱水→100%乙醇与冬青油 2: 1 与 1: 2 混合液依次过渡(亦可仅经过一次 1: 1 混合液) →冬青油透明, 换液 2 次, 第 2 次最好透明 24 小时→将材料连同冬青油转移到 Raj slide 或浅凹玻片上, 加盖玻片封藏→在干涉差或相差显微镜下通过调焦观察胚囊的不同光学切面。

### ②梅氏苏木精明矾染色—冬青油透明程序

将 FPA 固定的胚珠经逐级乙醇下行至蒸馏水, 在水中浸泡 2—24 小时—梅氏苏木精明矾(Mayer's hemalum)染色 1-2 天→自来水(或 0.1 碳酸氢钠溶液)换洗 2-24 小时→乙醇逐级脱水→无水乙醇与冬青油混合液过渡→冬青油透明→封藏后, 用明视野柯勒照

明法观察。

### ③爱氏苏木精染色—冬青油透明程序

将 FPA 固定原胚珠经逐级乙醇下行至蒸馏水→用稀释爱氏苏木精(Ehelichs henatosylin)在 20℃下染色 5—120 分钟。染色时间因植物材料和胚珠大小而异。爱氏苏木精原液的氧化成熟度对染色效果影响很大, 应用充分成熟的原液, 加等量或两倍的醋酸乙醇(45%醋酸与 50%乙醇等量混合液)稀释成染液→蒸馏水换洗 1-2 天→自来水换洗 1-2 天→乙醇逐级脱水→无水乙醇与冬青油混合液过渡→冬青油透明→用明视野柯勒照明法观察。适当缩小孔径光栏, 相应提高照明电压可以增加反差。

## (3)花粉的荧光染色、冬青油透明技术

### ①H33258 染液的配制

用蒸馏水溶液 Hoechst 33258(Sigma)配成 1mg / ml 的贮备液, 贮于冰箱中备用。数毫升的贮备液即可使用一年, 出现沉淀、杂质则不可再用。用 pH5 的柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲液将贮备液稀释为 20ug / ml 的染液, 此染液在冰箱中亦可保存月余。注意不可将冷藏的贮备液和缓冲液立即混合, 需用水浴略加温使其恢复为室温后方可混合, 否则 H33258 会析出沉淀。贮备液与染液均不可长久见光。

### ②花粉粒的染色透明程序

将含成熟或幼嫩花粉的花药固定于 Carnoy(3: 1)液中, 低温保存于 70%乙醇中→经逐级乙醇下行至蒸馏水, 并用水换洗数次除去酸液→捣碎花药, 将花粉置离心管中, 用 pH5 的柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲液浸泡数小时<sup>(9)</sup>→离心去缓冲液, 用 20ug / ml 的 H33258 染液(溶于同样缓冲液)染色过夜至 1 天。染色应在 25℃、黑暗条件下进行→乙醇逐级脱水→无水乙醇与冬青油混合液过渡→冬青油透明。透明时间宜在一天以上。材料在冬青油中低温避光保存一个月, 荧光染色依然保持→将花粉连同冬青油滴于载玻片上, 加盖玻片, 置荧光显微镜下, 用 U 或 V 激发滤光组合观察, 花粉核呈紫或蓝色。



### ③花粉管的染色透明程序

新鲜花粉接种在适宜的培养基中进行人工萌发。在培养基中事先加入 H 33258 贮备液使成 20ug / ml H33258 的浓度。在 25℃、黑暗条件下培养，一边萌发一边染色→吸取花粉管置离心管中，用 Carnoy(3: 1)液固定 1 小时→离心去固定液，用 50%乙醇换洗数次以除去酸液→逐级乙醇脱水→无水乙醇与冬青油混合液过渡→冬青油透明→荧光显微观察(同上方法)。

### 5. GMA 半薄切片制片法

1966—1968 年期间 Feder dQ' Brien 首先应用一种塑料—乙二醇甲基丙烯酸脂(即 GMA)包埋材料可切成 1—2μ 厚的切片，供光学显微镜观察，它介于石蜡切片和电镜的超薄切片。其特点是：

- ① 切片较薄，一般可切 1—2μ 厚切片；
  - ② 保存材料性能好；
  - ③ 染色简便；
  - ④ 提高分辨率，如传递细胞的内突即可分辨。是植物胚胎学较常应用的技术。
- 制过程基本上与石蜡切片相似，具体步骤如下：

(1)固定：用 3%戊二醛，水分较多的材料可用 6%浓度固定。配制时用磷酸缓冲液 0.025M。固定时间视大小而异，一般 3 小时，一般也需抽气。

(2)清洗：用磷酸缓冲液洗 1—2 小时，其中换 2—3 次。

(3)脱水：亦用系列浓度酒精脱水。即 30%、50%、70%、85%、95%，每级 1—2 小时，100%酒精(2 次)第二次纯酒精中加无水亚硫酸钠(每级 1-2 小时)。

(4)渗透：用 GMA 混合液渗透。可将材料放入称量瓶中，倒入 GMA 将材料淹没即可。放在干燥器中 1-2 天，中间可换一次。

(5)包埋、聚合：将渗透好的材料放至胶囊底部，倒入 GMA 液后盖上胶囊盖，放至 60℃温箱聚合。胶囊竖直放入温箱；亦可逐渐加温聚合(先 40℃0.5-1 天，再加至 60℃12 小时即可)的办法。固化后的材料可长期存放。

(6)切片和粘片：将包埋块头修成梯形。削平切面，用玻璃刀切片，厚度 1-2μ 左右。粘片时一般不用粘贴剂，用 70℃的温台，将切片放在载片水滴上烤干即可，低温易使切片脱落。

(7)染色：在烤片台一小时后即可染色。可用不固染料，一般用甲苯胺蓝 0 滴染 1-2 分钟，后用洗瓶冲洗。结果核染色质染成兰色，细胞质为紫红色，纤维素和淀粉则无色。

(8)封固：干燥后加一滴加拿大树胶，加盖片封藏即可。

#### 附 1: GAM 配制:

GMA	93 克
聚(乙)二醇 400(增塑剂)	7 克
过氧化苯酰(加速剂)	0.6 克

三者一定要充分混合，预先(半天)要配好，用磁力搅拌器混合，混后 pH 为 4.2---6 可用。

#### 附 2: 甲苯胺蓝--0 配制

将 0.05%甲苯胺蓝溶在 pH4.4 的 0.02M 苯甲酸钠缓冲液(0.25 克苯甲酸和 0.29

克苯甲酸钠，溶于 200 毫升水中)。

## (八)显微摄影术及放射自显术

### 1. 显微摄影术

生物科学领域中不少工作需要借助于显微镜来观察比较其微细结构特点。与此同时，工作者常常利用显微照相装置来拍摄显微镜视野中所观察到的物象，作为一种工作记录，这种技术称为显微照相术。这里介绍的目的是利用现有设备，以掌握显微摄影的基本方法。

#### (1)拍摄用具、用品

拍摄显微镜，连接器，DF 型 135 照相机，Z 型显微摄影仪，显微镜灯，快门线，滤光片，135 胶卷和感光散片等。

材料：任选植物制片

操作过程：

##### ①135 型小型显微摄影

a 取下显微镜目镜将显微摄影一端固定在镜筒上，再将目镜放入接圈中间；

b 安装显微镜灯，打开光源，调节显微镜光学系统，将光束调自视野中心并使视野亮度均匀。装上玻璃制片，把欲拍摄的部份移至中心。

c 将 135 相机装好胶卷，卸下镜头，并把照相机按在接圈上端。

d 安上快门线，并将快门调至 B 档。

e 从照相机的取景处进一步调焦，检查视野的亮度及均匀程度并将欲拍摄的部份调入取景器的范围。

f 根据视野亮度、材料的特点，确定曝光时间，按快门线使其曝光。

##### (2)Ø60mm 显微摄影装置

a 卸下显微镜镜筒，装上显微摄影器。

b 装好显微摄影照明灯，使光束合轴。

c 调节目镜视度圈，直到看清目镜分划板上中心的双十字线条为止。

d 调节显微镜，装上制片使目镜中分划板上成像清晰。

e 在斗形暗箱上装好散片暗盒(其内软片安放必须准确合适)调好光圈速度，记好拍摄的材料名称和内容，将暗盒抽板抽至定位线。

f 按动快门线使曝光，拍完立即将暗盒抽板推回原位，取下暗盒，即可冲洗。

操作时注意事项：

△拍摄前必须作好准备工作(如光源、调焦、滤光片选择使用与否及速度等)仔细检查无误后再行拍摄。

△装感光片时，注意药膜面的方向，装好后一定要检查暗盒是否严紧，避免漏光。

△拍摄时防止摄影机震动，否则会影响拍摄效果。

△初学时，正式拍摄前应进行分段曝光试验，以求掌握正确地曝光时间。

##### (2)冲洗

冲洗是经拍摄后的感光片，由潜影经过化学药剂处理变成负片的过程。即一般所

说的 冲胶卷(底版)。

实验用具、药品

冲洗瓷(塑料)盘、暗时钟、安全灯、显影罐、晾片夹、显影液，停影液，定影液等。

材料：已拍摄过的胶卷

操作过程：

冲洗有两种方式：即盆冲法和罐冲法。

①盆冲法(在暗室内进行)

a 冲洗前先配好显影液(D—76)、停影液和定影液(F—5)分别装入冲洗瓷盘中，各药液调解在 20℃左右，并从左至右显影—停影—定影的顺序排列在暗室的操作台上。

b 关好安全灯，检查暗室是否漏光(要求全黑条件)。

c 从暗盒中取出胶卷，先在水中将整个胶卷润湿，以保证显影均匀。

d 浸入显影液并同时记录显影时间，显影时可用两手分别持胶卷两端，两手上下交错倒动，使感光片均匀地通过显影液，或者在显影液中从胶卷一端开始，令其自然卷曲，由外变内，再由内变外，反复卷动。显影时间大约为 7—12 分(18—20℃)左右，显影时间超过规定时间的一半以后，可打开绿色安全灯，从远离安全灯处迅速检查显影情况。

e 如显影合适时，将底片迅速转移到停影液中操作方法同上。时间以底片完全浸润到停影液即可。

f 停影后马上转入定影液，使其定影，操作同上，时间约 15—20 分钟即可。

g 定影后，可打开室内灯光，将冲好底片，用流水彻底漂洗，除去底片的泥状物。1—2 小时后可将底片取出晾干，备用。

②罐冲法(可在有光条件下进行)

a 在暗室和暗袋里，将胶卷装入显影罐中，即把胶卷夹入显影罐的胶带中(注意不要使胶卷卷得过紧而与胶带接触而漏显)。盖上并旋紧显影罐上盖。以后步骤可在有光条件下进行。

b 从显影罐上盖缺口处倒入清水，注满后稍加振动或拍打显影罐底部，以排出附在底片上的气泡。再把清水全部倒出。

c 再从上部注满显影液，同样进行拍打底部并不断地旋动显影罐中轴，使底片均匀显影，显影 10—12 分钟后，倒出显影液，再将停影液或清水注入。

d 倒出停影液(或清水)后再注入定影液，旋转中轴，充分定影，15-20 分钟后，即可打开显影罐上盖，取出冲洗好的底片。

e 用流水彻底漂洗。

f 晾干备用。

注意：显影罐从暗室拿出后，直至定影结束以前，不得掀开显影罐上盖，避免“跑”光(曝光)。

注一、D---76 显影液 (微粒显影液)

水(50℃) ..... 750 毫升

米吐尔..... 2 克

无水亚硫酸钠..... 100 克

对苯酚二酚 ..... 5 克

结晶硼砂 ..... 2 克

加水至 ..... 1000 毫升

注二. D—72 显影液 (普通显影液)

水(50℃) .....750 毫升

米吐尔 ..... 3 克

无水亚硫酸钠..... 45 克

对苯二酚 ..... 12 克

无水碳酸钠..... 68 克

溴化钾 ..... 2 克

加水至 ..... 1000 毫升

注三、酸性坚膜定影液(F—5)

水(50-70℃) ..... 600 毫升

结晶硫代硫酸钠..... 240 克

无水亚硫酸钠..... 15 克

30%冰醋酸..... 45 毫升

硼 酸 ..... 7.5 克

铝钾矾 ..... 15 克

加水至 ..... 1000 毫升

注四、停影液

水 ..... 1000 毫升

28%醋酸 ..... 48 毫升

(28%醋酸的配制方法: 用冰醋酸 3 份, 加清水 8 份混合后即成)

(3)印相与放大

印相和放大是由负片(底版)转为正片(照片)的过程。印相是通过底版与相纸接触曝光, 再经显影而获得的同等大小的照片; 而放大则是底版上的象通过镜头的放大作用, 经过一段间距而在感光材料上曝光, 经过显影作用而获得的放大的照片。

用具与药品

印相箱, 放大机, 测焦器, 印相纸、放大纸, 切纸刀, 上光机, 显影液, 定影液等。

材料: 上一实验冲洗的底片

操作过程:

①印相

a 在暗室内红色安全灯下将印相纸切成所需的大小, 放入黑纸袋内。

b 把印相箱接通电源, 打开印相箱盖, 将底版放在黑纸框上, 药膜朝上, 取一张切好的相纸药膜朝下, 并与底版重叠吻合。

c 放下印相箱上盖, 用手稍加压力, 相纸即行曝光, 曝光时间为 3-8 秒之间。(在正式曝光前, 可进行分段曝光试验, 选择最佳的曝光时间)。

d 曝光后打开印相箱上盖, 取下印相纸, 进行显影(在红色安全灯下操作)显影程度可直接在红灯下观察而定。但一般显出的象在红光下, 要比正常情况深些为合适。

e 显影合适后, 经清水洗一下放入定影液中, 定影 10—15 分钟。

f 定影后可将照片置流水中漂洗, 使照片更为洁净。

g 将照片放上光机上烘干。

h 用切纸刀(或花边刀)修整, 备用。

②放大:

a 在红光安全灯下将放大纸切成需要的大小。放置避光处;

b 接通放大机电源, 将底片置于放大机底片夹处药膜向下;

c 根据需要, 升降放大机, 把物象调至适当大小后固定;

d 在放大机活动压板上放一张白纸(最好与放大纸一样厚度, 或用过期放大纸)调解镜头升降螺旋进行调焦, 最好利用测焦器在白纸上仔细观察, 使物象达到最清晰为止。

e 缩小镜头光阑(一般在  $1/2$  左右), 并将镜头下的红色滤光镜遮住镜头光束。

f 取切好的放大纸置于放大机底座的活动压板上, 打开镜头下的滤光片即行曝光, 曝光时间一般 5-20 秒左右甚至更长(视光强度、镜头与放大纸的距离, 底版药膜的厚薄及可变光阑开的大小等因素而定)最好在正式放大前进行分段曝光试验。找出适宜的曝光时间。

g 关闭开关, 取下放大纸进行显影, 以下的具体过程与印相相同。

## 2. 显微放射自显影技术与细胞内 DNA 及 RNA 合成的标记

### 实验用品

#### 器材

恒温水浴、暗盒、切片盒、搪瓷盘、塑料布、暗室或暗箱与暗袋、暗室用红灯、黑纸、玻璃推子和乳胶存放容器、橡皮筋、离心管、离心机、废液缸两个、染色缸。移液管、滴管、镊子、温度计、定时闹钟、显微镜等。

#### 试剂

(1)放射性同位素:  $^3\text{H}$  U—T 与  $^3\text{H}$ —U

(2)核 IV 乳胶

(3)Carnoy 氏固定液: 无水酒精: 冰醋酸; 3: 1(体积比)

(4)10%中性福尔马林固定液:

福尔马林(含乙醛 37%以上) : 蒸馏水=1: 10

混匀后用醋酸钠调至中性(pH=7)。

以上两种固定液贮存在棕色瓶内, 置 4℃冰箱保存。

(5) LD-19b 显影液(适用于核 IV 乳胶)

蒸馏水(50℃)	750ml
米吐尔	2g
无水亚硫酸钠	75 g
对苯二酚	8 g
无水碳酸钠	37. 5g
溴化钾	10g
蒸馏水加至	1000 ml

(6)酸性坚膜定影液(即 Kodak F-5 定影液)

蒸馏水(50℃)	600ml
海波(硫代硫酸钠)	240g
无水亚硫酸钠	15g
冰醋酸	15ml

硼酸(结晶)	7.5g
钾矾	15g
蒸馏水加至	1000ml

显影液、定影液配制时，均需等前一种药品完全溶解后，才能加入后一种药品。水加热是为了促进药品的溶解，但温度不能过高，配制好后稍冷却，过滤，贮存在棕色瓶中，置4℃存放。

#### (7) Giemsa 原液

Giemsa 粉末 0.5g，加 33ml 纯甘油，在研钵中研细，置 56℃ 保温 90 分钟，然后再加 33ml 纯甲醇，充分搅拌后过滤，置棕色瓶中备用。

(8) Giemsa 原液用 0.1mol / L 磷酸缓冲液作 10 倍或 20 倍甚至 50 倍稀释。

(9) 0.1mol / L 磷酸缓冲液：

- A.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  28.8g  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.67g  
溶于 1000ml 蒸馏水中。
- B.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  28.8g  
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.3g  
溶于 1000ml 蒸馏水中。

#### 实验方法(一)

##### 基本操作技术

放射自显影技术可因实验目的及要求不同而有不同的操作方法，但总的来说都应包括下列几个基本实验步骤：

#### (1) 放射性同位素引入机体或细胞

##### ① 渗入

- a 对成体动物进行注射(皮下、腹腔静脉或肌肉)；也可以口服，剂量一般为  $1.85 \times 10^4$  —  $3.7 \times 10^4 \text{Bq/g}$  体重。
- b 对植物可用含有放射性同位素标记物的溶液进行培养。
- c 对单细胞生物，如原生动物、细菌、病毒以及组培细胞可在培养液中加入放射性同位素标记物。剂量为  $1$  —  $43. \times 10^4$  —  $1.48 \times 10^5 \text{Bq/ml}$ 。

##### ② 标记方法

按引入同位素的时间分为持续标记、脉冲标记以及标记追踪。持续标记的时间较长，可以几小时至几天。脉冲标记时间较短。一般为数分钟至几十分钟。经脉冲标记的细胞可以进行标记追踪，即再将细胞放在正常的培养液中配养，对进入细胞内的同位素的动态与部位进行追踪。根据实验的目的要求选用适当的标记方法。

##### ③ 同位素的用量与单位

一般放射性标记物的剂量均用放射性强度  $10^7 \text{Bq}$  与  $10^4 \text{Bq}$  表示。放射自显影所用的量一般在  $10^4 \text{Bq}$  水平。经常使用的  $^3\text{H}$ ，剂量是每毫升几个  $10^4 \text{Bq}$ 。操作时认真细致，对人体则不会有伤害。

##### ④ 取材时间，根据实验的要求而定。

#### (2) 样品的制备

##### ① 制片

a 同位素标记的组织与细胞可按组织学常规方法制成石蜡切片，涂片、或压碎。石蜡切片在涂胶前要进行脱蜡：用二甲苯两次浸脱，每次 5—10 分钟，然后用无水酒精洗两次，每次 2-3 分钟，

b 离体细胞可在小玻璃片上单层培养制片。

## ②固定

固定液一般选用无水酒精、Carnoy 氏液、Bouin 氏液或中性福尔马林液。研究 DNA 合成的材料时，通常用 Carnoy 氏固定液，研究 RNA 合成与蛋白质合成的材料时通常用 10% 的中性福尔马林固定液。因为中性福尔马林能保存蛋白质和 RNA。

## ③贴片

用树胶作粘附剂，将样片粘附在干净载玻片上的 3 / 4 处。

## ④涂保护膜

为了防止标本中某些物质对乳胶造成非放射性的化学感光而形成假象，在涂覆乳胶之前必须在样片上涂一层保护膜来避免样品与乳胶的直接接触。一般是将样片浸入 0.5% 的明胶(内含 0.05% 铬矾)水溶液中，提取出来后，在 37℃ 下干燥。

## (3)乳胶膜的制备

### ①乳胶的融化

在暗室红色安全灯下，取一定量的核 IV 乳胶盛于一容器内，根据要求用重蒸馏水稀释成 1: 1 或 1: 4，可将容器放在 40℃ 水浴中 15-20 分钟，使凝胶变为溶胶。在加热时，可用干净的细玻璃棒缓慢搅拌，使乳胶充分混匀，但注意不要使它产生气泡。

### ②涂覆乳胶

乳胶的涂覆是一个重要的步骤，不能太厚，又要均匀。涂胶的方法较多，目前实验室中经常使用的是浸蘸法与滴胶法。

#### a 浸蘸法

将样片垂直地插入上述盛有溶化好的乳胶的容器中，注意使样品部分完全浸入乳胶中。然后取出，擦净玻璃片背面的核子乳胶，垂直地放在切片盒内或水平放于展片台上干燥。

#### b 滴胶法

载玻片在 37℃ 展片台上预热 3 分钟，用细玻璃滴管吸取溶化的乳胶，然后滴一滴在预热的载玻片的样品旁(一般用量 1 滴 / 3—3.5cm)，用细玻璃棒牵引乳胶，使之均匀地覆盖在标本及载片上。然后再把载片平放在 37℃ 的展片台上 1 分钟，使乳胶分布均匀。暗室中干燥。

## (4)曝光

放射性同位素放出的射线使乳胶感光称为曝光。曝光时间与同位素的种类、性质、剂量、半衰期以及乳胶性质等有关，也随实验的目的和方法的不同而稍有变化。因此必须通过实践来摸索。本实验中选用的曝光时间为一周。

在暗室中，涂好乳胶的片子干燥后，按组或按显影的先后顺序依次放在暗盒中。盒中放一小包干燥的硅胶作为干燥剂。暗盒盖严并用电工胶布将盒盖接合处粘好，再用黑塑料布或黑纸严密包好，做到完全不漏光，用橡皮筋扎紧，注明日期及实验项目等，然后把暗盒放在 4℃ 冰箱中曝光。

## (5)显影

一般照像用的显影液都可用于放射自显影的显影中。常用的显影液有 I. D—19b、KodakD—19b、D—72 等。显影操作过程如下：

①按 I. D—19b 配方，根据需要配制一定量显影液。

②过滤显影液，除去不溶性物质，以达到避免杂质污染标本的目的。

③将显影液预热到 18-20℃。

④将已曝光的白显影片子在暗室红色安全灯下取出，放入事先预热的显影液中显影 5—8 分钟(定时闹钟计时)。显影时务必注意显影液的温度、显影时间，并经常搅拌显影液。

⑤漂洗，将自显影片子从显影液中取出，放入蒸馏水中漂洗 30 秒钟。

#### (6)定影

定影过程是把那些来感光的卤化银从乳胶中溶去，而不损害银颗粒。

①按酸性坚膜定影液(即 F-5 定影液)配方制备一定量的定影液。

②用滤纸过滤定影液。

③将定影液预热到 18~20℃。

④将自显影片子从蒸馏水中转移到定影液中定影 15 分钟，

⑤冲洗目的是清除标本中含有的硫代硫酸盐，增进银粒的稳定性。先用自来水冲洗自显影片子 30-60 分钟，再用蒸馏水浸洗 1 分钟，然后干燥自显影片。

#### (7)染色

染色过程可按通常组织学染色方法，染液可以稀释，要求即能显示出组织结构，又能清楚地反衬出银颗粒，而且所用的染液不致消除显液的银颗粒。由于本实验是在自显过程完成之后染色，所以又称为“后染”。后染可用 Giemsa、Harris 苏木精，甲基绿—派洛宁(methyl green--pyronin)。

##### ①染色

向自显影标本上滴加 Giemsa 染色液 1—2 滴，染色 10—15 分钟，然后用自来水洗净染液。

##### ②染色后处理

a 脱水 可将标本放在 37℃下干燥，也可用浓度递增的酒精脱水。

b 透明 自显影片子放入二甲苯中透明 15 分钟，中间可换二甲苯液一次。

c 封片 向标本玻片上滴加 1--2 滴中性树胶，再覆盖上一张盖玻片。

#### (8)观察与结果分析

##### ①观察

微观自显影用中倍镜观察其黑度，计算标记细胞数，用高倍镜观察银粒的分布部位与数量。

##### ②标记指数

由于用的细胞不是同步化的细胞，因此在标记一定时间后有的细胞或细胞器中参入了标记物，而有些则没有。从标本上随机取上、下、左、中、右五个视野，计算各视野中标记的细胞数及细胞总数，或随机水平移动标本，计数 500-1,000 个细胞，并计数这些细胞中被标记的细胞数，可计算出标记细胞占计数细胞的百分数，即算出标记指数。



$$\text{标记指数} = \frac{\text{计数的标记细胞数}}{\text{计数的细胞总数}}$$

### ③定量测定

a 显微镜下自显影片与样片对照观察，可定量观察黑化密度计数银颗粒。

目前已有自动扫描计数或投影计数径迹法，也有显微光密度计测量法，都可用于定量测定。

b 绝对定量测定法。制一套标准样片，分别在射线计数器上记录放射性强度，然后自显影片与样片在同样条件下曝光、显影、定影、分别测量它们的显化度，加以比较，可计算出自显影片的放射性强度。

放射自显影技术是一种简便易行，应用广泛的技术，它有如下优点：

△可以定位、定量、定时，能把生化反应同形态、生理过程联系起来。可以在不破碎细胞的情况下，显示细胞中的生化反应，并可以检测到其它方法难以达到的微量水平(如一个细胞中参人的  $^3\text{H-T}$  的量)。研究细胞内代谢时可以说是目前最好的工具。

△操作简单，不需复杂的设备和仪器。主要实验材料是放射性同位素的标记物与感光乳胶，它们在国内都有商品生产，所以此技术在一般实验室都可应用。

这项技术的缺点是防止污染与废物处理比较麻烦。

如因条件限制，学生不能从头至尾自己动手操作时，可以从教师事先制备好的示范片中验证细胞核内 DNA 与 RNA 合成的标记以及染色体的标记等等。

### 实验方法(二)

细胞内 DNA 合成的标记：

#### (1) $^3\text{H-T}$ 标记组培细胞

##### ①培养细胞

每个青霉素小瓶中放入一块长方形的盖玻片，培养 BHK-21 细胞。

##### ②标记

当盖玻片 60-70% 的底面积长满细胞时，倒掉原培养液，然后加入 1ml 含  $^3\text{H-T}$  的培养液(浓度为  $3.7 \times 10^4 \text{Bq} / \text{ml}$ )，将小瓶置于  $37^\circ\text{C}$  恒温箱中培养细胞 30 分钟。

##### ③洗涤

取出长有细胞的盖玻片，放在冷切的 Hanks 液中洗 5 分钟(要两次更换 Hanks 液)以洗去玻片及细胞表面未掺入的  $^3\text{H-T}$ 。

##### ④固定

将盖玻片放入 Carnoy 氏固定液中固定 30 分钟，中间换液一次。

##### ⑤洗涤

70% 乙醇洗两次，每次 5 分钟，然后在空气中干燥。

##### ⑥贴片

在干净的载玻片的一端滴上一、二滴树胶，将盖玻片无细胞的一面贴附在载玻片上于  $37^\circ\text{C}$  下干燥两天。

##### ⑦编号

根据实验分组，标本统一编号。

##### ⑧涂保护膜

两张载玻片背面紧贴在一起，将有细胞的一端浸入 0.5—1.0% 的明胶中(或浸入 0.5% 醋酸纤维素的醋酸戊脂液中)，缓慢取出，分开两张载片，竖放于切片盒中，37℃ 下去燥。

#### (2)涂胶

①暗室外事先在一容器中加入 2ml 蒸馏水，进入暗室后，再倒入 2ml 核 IV 乳胶。容器置于 40℃ 水浴中保温 15 分钟，使乳胶溶化。加热 5 分钟后可用细玻璃棒搅匀乳胶。

②用浸蘸法或滴胶法涂布乳胶。注意使乳胶分布均匀，不宜太厚。然后于暗室放在金属展片台上干燥。

#### (3)曝光

#### (4)显影

#### (5)定影

#### (6)染色

以上四个步骤见“基本操作方法”一节。

#### (7)观察与结果分析

用  $^3\text{H-T}$  标记活细胞时，处理 S 期的细胞能吸收 DNA 合成的唯一特异性前体  $^3\text{H-T}$  进行 DNA 的合成。因此在细胞核内 DNA 合成部位可看到银颗粒，而核仁区一般不易标记。细胞质中的线粒体和植物细胞的叶绿体中也有  $^3\text{H-T}$  参入的现象。

①先在中倍镜、后在高倍镜下学习识别标记细胞和未标记细胞，并能区别假象，然后画图。

#### ②计算标记指数

#### 实验方法(三)

#### 细胞内 RNA 合成的标记

细胞内 RNA 合成的标记与上例基本相同，只是放射性同位素标记物不同。通常用  $^3\text{H-U}$  作为 RNA 合成的前体参入细胞。另外有经验证明在研究 RNA 合成时选用 10% 中性福尔马林固定液比 Carnoy 氏液效果好一些。

此后  $^3\text{H}$ —丙氨酸作为蛋白质合成的前体可标记蛋白质的合成，其标记方法也与 RNA 合成标记方法基本相同。

用  $^3\text{H-U}$  标记活细胞时，处于  $G_1$  期、S 期、 $G_2$  期以及 M 期早期的细胞都能吸收，用脉冲标记追踪，一般先在核仁区见到黑色的银颗粒，再逐渐扩及整个细胞核，以后放射性标记物又由核转移到细胞质中。因此用  $^3\text{H-U}$  标记细胞后，追踪一定时间取材，固定细胞，可看到活细胞中 RNA 合成、转移的情况。

观察后画图。注意仔细观察 RNA 合成、转移的情况。

#### 实验方法(四)

#### 放射性同位素标记染色体

#### (1)参入

当小方瓶 60-70% 的底面积长满细胞时，细胞正处于对数生长期，倒掉原培养液，加入 1ml 含有  $^3\text{H-T}$  的培养液(37℃，预热)剂量为  $3.7 \times 10^4 \text{Bq} / \text{mL}$ ，细胞于 37℃ 培养 30-60 分钟。

#### (2)秋水仙素处理

倒掉标记液，用预温的 Hanks 液洗两次，然后加入含秋水仙素的培养液 3-4ml(浓度

0.4-0.8  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ),  $37^{\circ}\text{C}$  下培养 8 小时。秋水仙素能够降解微管的结构, 导致有丝分裂过程中不能形成纺锤体, 使细胞停止于分裂中期。

### (3) 收集

用滴管先吸掉培养液, 然后加入预温的 0.075  $\text{mol} / \text{L}$  的  $\text{KCl}$  溶液 1  $\text{ml}$ , 摇动培养瓶, 这时进入中期的一部分细胞即脱离瓶壁。用滴管将细胞悬液转移到离心管中, 在  $37^{\circ}\text{C}$  下放置 30 分钟, 以使细胞膨胀。

### (4) 消化

向小方瓶中加入 0.25% 的胰酶 1  $\text{ml}$ , 置室温或  $37^{\circ}\text{C}$  消化细胞。瓶壁上出现针孔状的空洞时就倒掉胰酶。

### (5) 低渗处理

加入 0.075  $\text{mol} / \text{L}$  的  $\text{KCl}$  溶液 4  $\text{ml}$ , 用吸管吹打已分散细胞。将细胞悬液转移到上述的离心管中, 两次悬液合并。离心管置  $37^{\circ}\text{C}$  下保温 30 分钟。

### (6) 离心

向离心管中加入 0.5  $\text{ml}$  Carnoy 氏固定液, 吹打混匀后以 1000 转 / 分的转速离心 5 分钟。

### (7) 固定

吸去上清液, 加入 3  $\text{ml}$  Carnoy 固定液, 吹打散细胞后, 在室温下固定 15 分钟。然后再如上法离心两次。去掉上清液后加入 0.5—1  $\text{ml}$  新鲜的固定液, 充分混匀, 制成细胞悬液。

### (8) 制片

向载片上滴加细胞悬液 1 滴, 并铺开, 使细胞分散。干燥后涂保护膜。并根据实验分组, 标本统一编号。

涂乳胶、曝光、显影、定影、染色各步骤见“基本操作方法”一节。

### (9) 标记染色体的观察

先在中倍镜下观察, 识别银颗粒呈分散状态与聚集成一团的两种图象, 前者为处于 M 期的标记染色体, 后者为标记的间期细胞核, 再在高倍镜下观察几个标记染色体的图象, 并画图。

### 注意事项

形成假象的可能原因及其预防措施

除参入样品内的放射性同位素释放出射线形成黑色银颗粒外, 其它因素(如光、热能、化学能、机械能等)引起的银粒都属假象。实验过程中应采取相应措施避免或尽量减少假象的产生。需注意下列各点:

(1) 乳胶应在避光, 周围无放射源以  $4^{\circ}\text{C}$  的条件下保存。

(2) 实验室、暗室等应保持干净, 防止样品落上灰尘, 因为一粒尘埃就是一个黑点。

(3) 固定前务必将样品在冷却的等渗液内, 洗净吸附在玻片和细胞表面的放射性同位素。固定后也需将固定剂充分洗净。

(4) 暗室红灯必须检查是否安全, 操作时乳胶离红灯不要太近, 稀释乳胶时加水量不要太少, 融化乳胶时温度不能过高。

(5) 浸蘸法涂覆乳胶时, 要缓慢地提出玻片, 尽量使乳胶膜厚薄均匀; 滴胶法涂覆乳胶时, 玻璃推子要匀速前进, 避免指甲等碰及样品部位已涂好的乳胶膜。

(6)在 4℃及干燥的条件下曝光。

(7) 正确掌握显影液的温度、显影时间并搅拌显影液。

银粒增多的假象在显微镜下能看到,相对地易了识别。还有些因素能引起银粒明显减少,显微镜下不易识别,实验中更需引起注意。 主要有下列两点:

①放射性标记化合物应在 4℃下保存, 因为在过高或过低的温度下保存,易引起放射性标记化合物分解,标记时不能正常地参入机体或细胞。

②标记时要严格控制微环境对机体或细胞正常新陈代谢的影响,如标记组织培养细胞时,较低的温度常降低放射性标记化合物的参入率,而这又往往易被人们所忽视。

### 3 显微放射自显术

#### (一)标记的方法

在做标记时至少须注意明确以下三点:

① 需要用多少浓度的放射性化合物;

② 需要把材料和放射性化合物接触多少时间 (或叫脉冲的续时间 length of pulse);

③ 标记后需要清洗(或追洗 chase)多少时间。 这些资料一般在文献中都可以找到。就浓度来说,从 2uCi / ml 到 5mCi / ml 都有人用;标记的时间可以由一分钟至一星期;追洗的时间的变幅也可以由几分钟到几天,根据实验的要求而定。

#### (2)标记材料的固定

样品经标记后,便可以加以固定。一般都用常规的戊二醛和锇酸双固定以及环氧树脂包埋法。如要供光显微镜观察,可以首先把环氧树脂包埋的材料切成 1u 左右的薄切片,然后依照下面的方法涂上感光乳剂。

#### (3)环氧树脂光显微镜自显术

①在载玻片中涂一层 0.5% 的白明胶。

方法: 将 0.5 克白明胶,溶在 100 毫升的蒸馏水中(需加微热使白明胶加速溶化)。然后让溶液冷却至 21℃。把干净的载玻片插入溶液内,然后慢慢抽出,风干,备用。

②在涂有明胶的玻璃片上,放一滴蒸馏水。用针将切片从玻璃刀的水槽中捞起,转移至载玻片的水滴上。在 40℃加热板上烤干。每滴水中约放 4-5 块切片。

③把切片涂上一层液体的感光乳剂(NTB-2 柯达出品)。在全黑或配有 Wrattan2 滤光片的灯下操作,方法如下:把感光乳剂放在 42℃(乳剂一定得达到这个温度才能溶化)的恒温水槽中恒温一小时(50 毫升的乳剂,大约可以一次过涂 30 块切片)。将载玻片背对背合起来,一齐插入乳剂,然后把载玻片慢慢地抽出乳剂,分开,然后一块块地用衣夹吊起,在室温风干 2 小时。乳剂干后,便可以装进暗盒里。盒内先放一些干燥剂(用布包一些硅胶(silicagel),将盒密封,在 4℃下曝光。每隔一或两天,取几块载玻片出来冲洗。

④冲洗方法(在全黑或配有(Wrattan2 过滤片灯下进行操作)。

a 用柯达 D19\*显影液显影 7 分钟(温度保持在 17℃)

b 蒸馏水清洗 30 秒种(温度保持在 17℃)

c 定影(一般酸性坚膜定影液) 3 分钟(温度保持在 17℃)

d 水洗 20 分钟(室温)

e 风干

\*柯达 D19 显影液的配法如下:

水(50℃)

500 毫升

米吐尔	2 克
亚硫酸钠(sodium sulfite)(无水)	90 克
对苯二酚(hydroquinone)	8 克
碳酸钠(sodium carbonate monohydrated)	52. 2 克
溴化钾(potassium bromide)无水	5 克
用冷水加至	1 升

**\*\*定影液的配法(柯达 Fixing bathF-5)**

水(50℃)	600 毫升
碳酸钠(sodium thiosulfate pentahydrated)	240 克
亚硫酸钠(sodium sulfite)(无水)	15 克
28%醋酸(即 3 份醋酸 8 份水)	48 毫升
硼酸(boric acid), (一定要用结晶体的)	7. 5 克
钾矾(potassium alum dodecahydrated)	15 克
用冷水加至	1 升

#### (f)染色

放几滴 2-5%Giemsa 在切片上, 在 40℃的加热板上放置 30 秒至 2 分钟, 然后用水清洗干净, 烤干。在加热板上烤片, 温度不要超过乳胶的溶化温度(即 42℃), 不然切片会被溶化的乳胶污染。假如染色有困难, 可以不染色而在相差显微镜下观察和拍照。

#### 4. GMA 薄切片和光学显微镜自显术

最近 Raghavan 很简单地报导了有关利用 GMA 切片来做光显微镜自显术的方法程序如下:

切 5-7 $\mu$  厚的 GMA 切片, 在切片上涂一层柯达 NTB<sub>3</sub> 乳胶, 然后曝光。用柯达 D-19 显影。再用 AzureB 来染色, 最后用 Euparal 封片。从他所发表的照片来看效果是不错的。

#### 5. 电子显微镜放射自显术

现在国外用得比较多的, 供电子显微镜观察的放射自显术用感光乳剂有两种: (1)英国伊尔福(Ilford)的 L<sub>4</sub> (晶体直径在 120-180nm 之间); (2)美国柯达(Kodak)的 NTE(晶体直径在 70-90nm 之间)。NTE 由于溴化银晶体直径小, 所以分辨力比较高。但缺点是不能长期贮存。NTE 在 4℃只能贮存约 4 星期左右, 而 L<sub>4</sub> 则能贮存六个月以上。最近美国柯达又出了一种新的乳剂——Kodak special product type 129—01, 性能比 NTE 好。

在用 NTE 或 L<sub>4</sub> 之前, 先要将乳剂稀释至适当的浓度。所谓适当的浓度是指只有一层单层(monolayer)的乳剂敷在切片上。因此在敷乳胶之前一定要在电镜下检查一下乳胶是否能形成单层和均匀完整。

现今最常用的把乳胶敷在切片上的方法有两种: (A)浸片法(dipping method)和(B)圆环法(loop method)。

##### (A)浸片法

先用烈火将一些干净的载玻片烧至将软阶段, 然后放在几枝直立的针上冷却, 备用。将烧光滑的载玻片插入 0. 2%(溶在醋酸乙酯内)的火棉胶, 抽出, 风干。然后将染了色的超薄切片放在涂有火棉胶的水滴上, 风干。喷涂一层碳在切片上, 这是用来防止切片内的固定剂和染料与乳胶起化学作用。在暗室(用柯达 Wrattan1A 滤光片照明)把乳剂热至适当的温度(NTE60℃; L<sub>4</sub>45—60℃)把载玻片插入溶乳胶内, 浸约 1—2 秒钟, 然后慢慢

抽出，吊起风干。装进藏有干燥剂(silica gel)的暗盒里，在 4℃ 下曝光几个星期至几个月时间，根据实验要求而定。曝光后要用适当的显影液显影，因为显影液会影响显现出来的微粒(grain)的大小和分辨力。国外一般用柯达 D19 或 Microdol-X 在 20℃ 显影 2—3 分钟；也可以用柯达(Dektol)显影液(稀释 1+2)在 24℃ 显影 1 分钟，显影后便可以清洗(10 秒钟)，然后固定影像(30 秒钟)，再用水清洗 2 分钟。定影后，用针在切片周围刻划一个圆圈，放一滴 1% 的氢氟酸(hydrofluoric acid)的圆圈上，让氢氟酸渗在火棉胶下面，促使火棉胶和载玻片脱开，让切片浮起。用针将浮起的火棉胶和切片混合体捞起，放在清水中清洗，然后平放在铜网上，便可在电镜下观察。

#### (B)圆环法

将超薄切片放在电镜的铜网上，染色，喷涂碳层，然后用双面胶纸把铜网的边缘粘在一条 1X 0.6 厘米的棒上。另外用一个白金丝做的圆环(直径 3-5 厘米)，将预先敷在圆环上的单层乳胶(mono layer)平放在铜网的切片上。装进暗盒里，放进一些干燥剂(Silica gel)，在 4℃ 下曝光，然后显影(方法与浸片法同)。将乳剂敷在圆环时需要注意，先把圆环放直，再浸泡在乳剂中，然后慢慢抽出。乳剂必须保持在 18—20℃，这样圆环上便会形成一层乳胶单层。当乳胶单层在环中稍干，呈现紫色(L<sub>4</sub>)或银/黄色，NTE 时，立刻将乳胶敷在切片上。

## (九)植物胚胎学的组化分析

### 1. 过氧化酶测定

#### (1)试剂配制：

甲液：0.2% 联苯胺的 95% 酒精溶液，每 100c.c 中加入冰醋酸 1c.c，成为联苯胺—冰醋酸混合液。

乙液：1% 过氧化氢液(用时现配)

#### (2)操作过程：

取一花将雄雌蕊作纵切，每个雌蕊至少切 3 片，取较薄的新鲜切片于载片上，滴上甲、乙等量混合液，并加上盖片，约 5 分钟左右进行镜检，如出现深兰色或棕褐色，表明含有过氧化酶。

### 2. SH-化合物的测定

#### (1)试剂配制

甲液：用 95% 酒精配制的 5% 醋酸锌。

乙液：5% 亚硝基铁氰化钠水溶液。

#### (2)观察过程

新鲜材料进行组织切片后，置于甲液的载片上 10—15 分钟，为防止材料变干可加盖片，然后将材料移入乙液内 10—15 分钟，在显微镜下观察，如有 SH—化合物则切片出现玫瑰红色。

### 3. 抗坏血酸的测定

将 10% 硝酸银(1% 醋酸水溶液配制)滴至载片上，并放上雌雄蕊切片后，置黑暗处 15—20 分钟后，取出载片，如有抗坏血酸则呈黑色。

#### 4. 多肽酶的测定

将三氯化铁(用高于 10% 的酒精作成饱和溶液, 滴数滴与载片上, 放置新鲜材料(切片)于试液中, 加盖片后置 10—15 分钟, 用显微镜观察如有则呈兰紫色或黑褐色。

#### 5. 淀粉的测定

用稀释的碘化钾溶液, 滴至雄蕊或雌蕊组织切片上, 如呈兰黑色, 则表明淀粉的存在。

#### 6. 雌蕊各部的 pH 值测定

利用活体观察柱头, 花柱及子房等部分的酸碱度差异, 对进一步理解受精过程是生理过程具有重要意义。

##### (1) 中性红标准比色剂的制备

用 0. 1NNaOH 和 0. 1NHCl 水溶液, 加一定量的中性红水溶液, 调整 pH 值与标准颜色相同为止, 分别做成 pH3、4、5、6、7、不同等级的比色计, 加以标注, 并用石蜡封闭, 配制时, 需将指形管洗净以免影响 pH 值变化。

##### (2) 检查过程

将鲜花中的雌蕊用镊子取出, 用保安刀片自柱头、花柱、子房和胚珠作徒手纵切片(每一雌蕊切成 3--4 片)并将所得材料列载于载玻片上, 滴 1—2 滴中性红水溶液后, 加盖片, 在显微镜下顺序检查柱头的乳突细胞, 柱头组织、花柱、子房壁, 胚珠等各部分组织的颜色, 并与中性红标准计随时比较。由于中性红指示范围较大, 又系活体染色, 因此必须仔细观察比较。

#### 7. DNA 鉴定

(1) 用二甲苯溶解石蜡, 必要时可用火棉胶盖上一层, 以后通过系列酒精下降到水。

(2) 60~C1N 盐酸水解 10 分钟。

(3) 水洗

(4) 定温用席夫试剂染色 2 小时。

(5) 水洗, SO<sub>2</sub> 液 2 次各浸 10 分钟。

(6) 水洗半小时。

(7) 用 3 级丁醇系列彻底脱水, 后入二甲苯, 加拿大树胶封藏。

#### 8. RNA 鉴定

(1) 与前相同, 用二甲苯溶解石蜡, 用系列酒精下降至水。

(2) 用甲基兰一二苯氧(杂)芑胺(Pyronine)染 6—7 分钟, 染色液如下述那样配制:

用氯仿把二氧(杂)芑胺(Pyronine 即派罗宁 YC<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>20</sub>Cl)6 次剔除杂物, 把它溶解于蒸馏水中制成 20% 溶液。同样甲基兰也用氯仿将上层透明剔除不存物, 把它用蒸馏水配成 2% 溶液, 派罗宁 y 溶液 12. 5ml 甲基兰溶液 7. 5ml, 加入 30ml, 蒸留水后可得染色液。

(3) 为快速除去多余染色液用蒸馏水洗。

(4) 用 n 一丁醇分色, 分色兰为了防止深浅不均, 约 5 分钟。

(5) 通过二甲苯, 加拿大树胶封, 定量的光学性测定用 540mu 进行。

#### 9. 蛋白质鉴定

(1) 通过二甲苯、酒精等与前相同。

(2) 在 1% 醋酸溶液中, 溶解成 1% 的萘酚黄 S, 染色 15 分。

(3)室温 15—24 小时用 1%醋酸分染。

(4)3 级丁醇系列脱水。

(5)通过二甲酚，加拿大树胶封。定量光学测定用 440—490nm 进行。

#### 10、显示淀粉、蛋白质和脂肪物质的永久制片法

多糖类、蛋白质、脂肪常常以淀粉粒、蛋白体糊粉粒)和油滴形式贮存在植物细胞中。花粉、胚囊、胚和胚乳在发育过程中，这几种物质的动态代表了营养物质的运输，利用贮存的状态。淀粉粒、蛋白体和油滴用简单的显微化学试剂可以加以鉴定例如用碘——碘化钾溶液鉴定淀粉(蓝色反应)和蛋白体(黄色)；新鲜的材料用苏丹 III 染色，油滴被染成红色。不过这些测试方法只能用于临时的观察。为了制作显示淀粉粒的蛋白体的永久切片。可用寻常的石蜡切片法将组织切成 5—8 微米的切片，应用多糖类的组织化学染色法显示淀粉粒。用与蛋白质有特异结合能力的染料染蛋白体。制作显示油滴的永久切片，同样可以用石蜡切片法，但一般的固定剂不能保存贮藏的脂类，需用四氧化锇(通称锇酸)固定。油滴经固定成为黑色，不经染色即以显示。

##### (1) 材料的固定、脱水包埋和切片

本实验用花生成熟胚的子叶为材料，分二组处理制作石蜡切片。

##### ①用于显示淀粉粒和蛋白体的切片：

材料固定于卡诺氏(Carnoy)固定液，约 1 小时，按石蜡法进行脱水、透明浸蜡和包埋。制作 5—8 微米厚的切片备用。

##### ②用于显示油滴和同时显示淀粉粒和蛋白体的切片。

材料固定于 2%锇酸中(用重蒸水配制)。由于锇酸穿透速度很慢，固定的组织块不宜过大，一般切成 2x 2x 2 毫米的小块，固定 24 小时，固定的材料，须经流水冲洗 12—24 小时(务必彻底洗净，否则遇酒精即发生黑色沉淀，然后各级酒精脱水、透明、浸蜡和包埋。制备显示油滴的切片要薄、厚的切片油滴密集分辨不清，最好切成 3—4 微米厚。

##### (2)染色

##### ①用高碘酸—锡夫(Periodin acid-schiff)反应法显示淀粉粒。

植物细胞中的多糖、含水维生素的细胞壁和淀粉。都无专一的染料可用于永久制片的染色。高碘酸—锡夫反应法(简称 PAS 反应法是鉴定多糖类物质良好的组织化学方法)。淀粉和半纤维素在高碘酸作用下，使化合物中的连位羟基被氧化成醛基，醛基和锡夫试剂中的无色亚硫酸品红结合而产生红色反应。

试剂配制：

##### a 高碘酸液

高碘酸钾(KIO <sub>2</sub> )	0.5 克
蒸馏水	100 毫升
或 高碘酸钾	0.5 克
0.3%硝酸	100 毫升

##### b 锡夫(Schiff)试剂

用 0.5 克碱性品红溶于 100 毫升煮沸的蒸馏水中，搅和，冷却 50℃，过滤到一棕色小口瓶中，并加入 10 毫升 1NHCl 和 0.5 克偏亚硫酸氢钠(NaHSO<sub>3</sub>)。摇匀，将瓶盖塞紧，置于黑暗处，约经 18 小时后，染色液变为淡茶色或无色，即可使用。



#### c 漂洗液

1NHCl	5 毫升
10%偏亚硫酸钠	5 毫升
蒸馏水	100 毫升

此液用于锡夫试剂染色后漂洗，必需新鲜配制。溶液若无 SO<sub>2</sub> 的刺激味即不能使用。

#### 染色步骤

- a 固定 TCarnoy 液的切片脱蜡经系列酒精至蒸馏水
- b 在 0.5%高碘酸钾的 0.3%HN0<sub>3</sub> 溶液中，10 分钟。
- c 自来水冲洗 5 分钟。
- d 蒸馏水洗。
- e 用锡夫试剂中，30 分钟。
- f 漂洗液中洗 3 次，每次 2 分钟。
- g 自来水洗 5 分钟。
- h 脱水、透明、封固。

结果：淀粉染成深红色，纤维素细胞壁也呈红色反应。

#### ②用汞-溴酚蓝(meroury-bromphenol blue)或萘酚黄 S(naphthoe yellows)染蛋白质。

有多种染料可用来专染蛋白质。汞溴酚蓝和萘酚黄是常用的两种，在染花生子叶细胞中贮藏的蛋白有很好的效果，特别是在用 PAS 法染色后，再选择其中一种复染，可在一张切片上同量显示淀粉和蛋白体。

#### 汞-溴酚蓝染色法

染色液配制 下列两种配方都可应用：

▲HgCl <sub>2</sub>	10 克
溴酚蓝	100 毫克
蒸馏水或 35%酒精	100 毫升
▲HgCl <sub>2</sub>	1 克
溴酚蓝	500 毫克
2%醋酸	100 毫升

#### 染色步骤：

- a 固定于 Carnoy 液的切片脱蜡经系列酒精至蒸馏水。
- b 溴酚蓝染色液中染 20 分钟(时间长不影响染色深度)。
- c 在 0.5%醋酸中漂洗 10 分钟洗去多余的染料。
- d 在水中洗 15 分钟。
- e 在 pH6-7 缓冲液中 3 分钟，使染色转蓝(如果切片直接入叔丁醇脱水，可免去此步。
- f 脱水、透明、封固。

结果：蛋白体为深鲜蓝色。

切片如果希望同时显示淀粉粒的蛋白体，在经 PAS 法染色后再用汞-溴酚蓝染色法染。

#### 萘酚黄 S 染色法

染色液配制

萘酚黄 S 1 克

1%醋酸 100 毫升

上液作为基液，用时用 1%醋酸稀释基液比例为 2: 100。

染色步骤

a 固定 Carnoy 液的切片脱蜡经系列酒精至蒸馏水。

b 萘酚黄 S 染色液中染 2 分钟。

c 蒸馏水洗。

d 叔丁醇脱水，更换 2 次，每次 2 分钟或更长。

e 二甲苯透明，树胶封固。

结果：细胞中贮藏的蛋白体鲜黄色。

切片先用 PAS 染色，然后染萘酚黄，红色的淀粉与黄色的蛋白体对比鲜明。

(3)用钼酸固定的切片同时显示油滴，淀粉粒和蛋白体

用钼酸固定的切片不经染色可显示油滴，再经 PAS 法染淀粉粒和用萘酚黄染蛋白体，这样，可以同时显示三种贮藏物质。结果油滴黑色，淀粉和纤维素细胞壁红色，蛋白体黄色。用钼酸固定的材料。不能用汞—溴酚蓝染色，用橘红 G (orangeG) 代替萘酚黄染蛋白体也能得到很好的效果。

上述的显示多糖的 PAS 法和显示蛋白质的汞—溴酚蓝法可用于物质的定性和定位的检查，如果切片厚度不一致，也可作为相对含量的比较。

#### 11、小麦受精过程中酸性磷酸酶的超微细胞化学定位

田国伟、申家恒等以春小麦 (*Triticum aestivum*) “龙辐 50339 号”。按申家恒等描述的方法，分别取授粉前后的小麦子房。连续 3 年重复。样品初固定于 50 mmol / L 二甲胂酸钠缓冲液 pH7. 2) 配制的 2. 5% 戊二醛和 4% 的多聚甲醛混合固定液中，室温固定 2 小时。经预冷的相同缓冲液洗涤 2 次，再用预冷的 50 mmol / L 醋酸缓冲液 (pH5. 0) 洗涤 3 次，共 5 小时。在醋酸缓冲液洗涤时，用锋利的双面刀片将小麦子房沿腹沟纵切两半，以利酶反应渗透。酶定位采用 Gomori 法，酶反应液配方按 Sexton 和 Hall。材料置反应液中于 37℃ 温育 8 小时。以反应液中不加底物 β—甘油磷酸钠和反应液中加入酶抑制剂 NaF 为对照。酶反应后，用 50 mmol / L 醋酸缓冲液 (pH5. 0) 洗涤 3 次，重蒸水洗 3 次，共 4 小时。第 2 次固定用重蒸水配制的 2% 钼酸，4℃ 下过夜。重蒸水洗 4 小时，各级丙酮脱水，Epon812 环氧树脂渗透并包埋。LKB-NOVA 型超薄切片机上切片。切片不经任何染色直接在 H—300 型透射电子显微镜下观察和照相。

#### 12. 小麦胚珠在受精过程中 ATP 酶的超微细胞化学定位

田国伟、申家恒等以春小麦 (*Triticum aestivum*) “龙辐 50339 号”。按以前的方法，分别取授粉前成熟胚囊、受精过程中及合子时期的小麦子房。按简令成等 (1980) 的方法制样 (略有改动)。即：用 50 mmol / L 二甲胂酸钠缓冲液 (pH7. 2) 配制的 2. 5% 的戊二醛和 4% 的多聚甲醛混合液，在室温下固定 2 小时。用预冷的 50 mmol / L 二甲胂酸钠缓冲液洗涤 2 次，再用预冷的 50 mmol / L Tris—顺丁烯二酸缓冲液 (pH7. 2) 洗涤 3 次，共 3. 5 小时。在缓冲液洗涤时，用锋利的双面刀片将小麦子房沿腹沟纵切两半，以利酶反应液渗透。酶反应液组成：50 mmol / L Tris—顺丁烯二酸缓冲液 (pH7. 2) 中含  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  3 mmol / L， $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ —ATP (钠盐) mmol / L。材料置反应液中于 22℃ 下温育 4 小时。以反应液中不加底物 ATP 和反应液中加人 NaF 抑制剂为对照。酶反应后用 50 mmol

/ L Tris 一顺丁烯二酸缓冲液洗 2 次, 50mmol / L 二甲胂酸钠缓冲液洗 3 次, 共 3 小时。置以二甲胂酸钠缓冲液(pH7. 2)配制的 2% 钨酸中于 4℃ 下过夜。双蒸水洗 4—5 次, 共 4 小时。按常规方法经各级丙酮脱水, Epon812 环氧树脂渗透和包埋。在 LKB-NOVA 型超薄切片机上进行超薄切片。材料不经任何染色直接在 H—300 型透射电子显微镜下观察和摄影。

#### (十)植物胚胎学的电镜技术

##### 1. 透射电镜生物样品制备

电子显微镜样品制作原理与光显微镜标本制作原理基本相似, 但因电子显微镜是以电子

束为光源, 由于样品各部组成密度不同而电子束透过的量有所差异, 因而呈现出明暗不同的物象。这种制片的厚度要求在 500-700Å 范围, 即通常所说的超薄切片。因此, 超薄片的各个环节与石蜡切片有明显差异。

本实验要求同学掌握透射电镜样品制备的基本过程, 为进一步工作打下初步基础。

##### (1)主要仪器与试剂用品

超薄片切机、制刀机、冰箱、温箱、搅拌器、解剖镜、显微铜网, 胶囊玻璃刀等, 配制各种试剂的玻璃用具。

主要药品有: 固定剂(戊二醛, 钨酸)磷酸缓冲液, 丙酮、环氧树脂, Formvar 制膜试剂, 电子染色试剂(醋酸双氧铀、枸橼酸铅, 生物染剂(蕃红、固绿)浓  $H_2SO_4$ 、氯仿酒精、NaOH, 重蒸馏水、二甲苯、加拿大胶等。

##### (2)材料: 甜菜或自选

##### (3)操作过程:

①取材: 将新鲜材料, 在低温蜡板上用锋利刀片将材料分割成  $1mm^3$  粗细的小条, 取材时要考虑定位定向, 为防止将材料挤压, 分割时不用镊子和解剖针而用牙签轻轻操作。

②前固定: 将分割好的材料迅速移入 2—5% 戊二醛 (用 0. 1M 缓冲液配 pH7. 2-7. 4)的青霉素瓶中固定, 4℃ 冰箱时间 2 小时。

③冲洗: 用 0. 1M 磷酸缓冲液进行冲洗 4℃ 冰箱 2 小时。

④后固定: 在固定前将材料再切成  $1mm^3$  左右的小块, 然后放入 1% 钨酸(0. 1M 磷酸缓冲液配制)固定, 仍在 4℃ 冰箱固定 2 小时。材料经钨酸固定后变成黑色。

⑤水洗: 用双蒸馏水洗 5 分钟, 换三次。

⑥脱水: 用各级丙酮逐级脱水, 即

30% → 50% → 70% → 80% → 90% (每级 15 分钟 4℃ 冰箱) → 100% 丙酮 → 100% 丙酮 → 100 丙酮(每级 10 分钟在室温下进行)。

##### ⑦浸透包埋:

将脱水完毕的材料移入事先配好的环氧树脂 618 的包埋剂中浸透一夜(在 37℃ 温箱中进行)。

包埋:

a 将包埋器具如(胶囊、牙签、镊子, 硫酸纸等)预先放 60℃ 温箱干燥 1 小时;

b 选取一胶囊, 用牙签轻轻地挑取一块浸透好的材料放入胶囊底部正中, 使切面向下, 随即将胶囊垂直加入纸盒盖上的孔洞中;

c 用铅笔在硫酸纸条上写出材料名称或代号，将纸条放入胶囊内中上部(字的方向朝下)；

d 将包埋剂徐徐倒入胶囊，其量大约 2 / 3 左右；

e 包埋完了将材料连同纸盒放入温箱中聚合。

⑧ 聚合将温箱调至 80℃，待温度稳定后将材料放入烘烤，1.5--2 天后，聚合结束，取出包埋块，用 50℃ 温水洗去胶囊，干燥后分组置于干净的青霉素瓶中保存备用。

⑨ 修块： 为便于切片， 必须把标本削成适当大小和形状。其办法是将包埋块固定于金属座上，右手持单刃刮脸刀片，左手把住标本，在立体解剖镜下进行修整。

要求修成具 4 个斜面的锥形台，粗修时保持原材料的最大切面，各面要求光滑，并要削去一角便于定位。

⑩ 半薄切片： 用旋转切片机改装或半薄切片机，将材料切成 1μ—0.5 μ 左右的切片，制成光学显微镜的玻璃标本（与一般石蜡切片制片相同），镜检， 以确定电镜观察的部位。

#### 11 超薄切片：

a 在半薄切片基础上定位，再将组织块进行精修保留电镜观察的部位，修去多余的部分。

b 利用制刀机制刀，选择合格的玻璃刀后，用胶布做成水槽。

c 在熟悉超薄切片的操作基础上安装材料和；巧刀进超薄切片， 切片厚度要在 500—700 Å 左右，（切片呈银白色）。

d 把切好的片子，用预先制好的具 Formvar 膜的铜网捞取，放在平皿干燥（注意在平皿滤纸上应标注铜网上材料的编号，以防混乱）。

#### 12 电子染色：

a 取带蜡板的平皿，滴数滴 4% 醋酸双氧铀的 4% 酒精溶液。将铜网分别放入滴液中“染色” 15 分钟(注意因铀是放射性元素，操作时一定要准确，谨慎)。

b 取 3 个 2 毫升的小烧杯，分别倒入蒸馏水后，将铜网夹住先后通过（1-3）水中进行水洗。

c 另取一蜡板平皿，再滴上数滴枸橼酸铅液，把水洗后的铜网放入滴液 15 分钟。

d 再取 4 个 2 毫升的小烧杯，分别倒入 0.01M NaOH → 蒸馏水①→蒸馏水②→蒸馏水③，将铜网再从上面 4 个烧杯中顺序通过， 最后放在铺上滤纸的平皿中。以备上电镜观察。

附：各试剂配制

（1）3% 戊二醛的磷酸缓冲液配制

①磷酸缓冲液：

a 0.2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶液：

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	35.61 克
（或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	53.65 克
或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ .....	71.64 克
加蒸馏水至 .....	1000 毫升

b 0.2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶液：

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	26.6 克
---	--------

(或  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ..... 31.21 克  
 加蒸馏水至 ..... 1000 毫升  
 0.1M 磷酸缓冲液:

pH	a 液毫升数	b 液毫升数	加蒸馏水毫升数
7.4	40.5	9.5	50
7.2	36.0	14.0	50
7.6	43.5	6.5	50

②3%戊二醛的磷酸缓冲液(pH7.4)

0.1M(pH7.4)酸缓冲液 ..... 50 毫升  
 25%戊二醛水溶液 ..... 12 毫升  
 加蒸馏水至 ..... 100 毫升  
 酌加 1—3ml 无水氯化钙(分子量为 110.99)

(2)冲洗液:

0.1M 磷酸缓冲液(pH7.4)磷酸缓冲液..... 1000 毫升  
 蔗糖 ..... 68.4 克

(蔗糖在使用前半小时加入, 加入量以 0.2M 计, 蔗糖分子量为 342.29)

(3)1%钨酸磷酸缓冲液

钨酸 ..... 1 克  
 0.1M 磷酸缓冲液(pH7.4)磷酸缓冲液..... 99 毫升  
 无水氯化钙 ..... 1—3ml 量

(4)国产环氧树脂#618 包埋剂配制:

国产环氧树脂#618(包埋剂)..... 2 克  
 顺丁烯二酸酐(硬化剂) ..... 0.84 克  
 邻苯二甲酸二丁酯(增塑剂) ..... 0.20 克  
 二乙基苯胺(加速剂) ..... 0.10 毫升

配制过程: 称取#618 于小烧杯, 再加入称好的硬化剂, 置于 70℃烘箱使硬化剂溶化, 并充分搅拌, 取出溶液室温下冷却再加入增塑剂, 放电磁搅拌器搅拌, 在使用前半小时, 用 0.5 毫升注射器逐滴加入, 边加边搅, 使四种成分成均匀体系, 否则聚合不好。

(5)枸橼酸铅染液配制:

硝酸铅 ..... 1.33 克  
 枸橼酸钠 ..... 1.76 克  
 二次蒸馏水 ..... 30 毫升

上述试剂置 50 毫升容量瓶中, 猛烈摇动 1 分钟, 再用电磁搅抖器搅 30 分钟, 直到形成乳白色混浊液为止, 然后加入 8 毫升 1NNaOH, 溶液则变成透明, 再加蒸馏水至 50 毫升(pH12 左右否则需重配)。用时需用 0.01NNaOH 溶液稀释 5 倍, 混匀后离心(5 分钟 / 2000 转), 用注射器取上清液进行。

(6)钢网 Formvar 膜制法:

①铜网处理: 铜网选择后压平、清洁→浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$ (3—4 分) →自来水洗涤数次→5%氨水洗一次→蒸馏水洗三次→100%酒精中浸 2 分钟→放平皿加盖、留缝置 45℃温箱

中干燥。

②制膜过程：取洁净载玻片垂直深入 0.25%Formvar 的氯仿溶液中→取出用滤纸吸去多余的 Formvar 液→稍干后用刀片将膜划成一个长方形，缓慢插入水中，使膜飘浮液面→把干燥铜网分别摆在膜上→最后用滤纸粘附放入平皿中备用。

## 2、电镜操作要点

制好透射电镜生物样品之后，即可上电镜观察。电镜一般均有专人负责操纵。对于研究者来说，主要精力应集中在对样品的观察和分析上，本实验的目的，通过示范操作达到熟悉透射电镜的结构，了解电镜的使用步骤，与此同时了解电镜下超微结构的特点。

具体内容由电镜室有关人员负责介绍有关情况与示范操作。为使学员对电镜使用预先有一个初步了解，这里以国产 DX 201 型电子显微镜的使用步骤，简单介绍如下：

(1)开机：接通总电源拨调压开关  $K_1$ ，使仪表  $S_2$  指示为 220 伏。

(2)抽真空：把开关  $K_4$  拨向真空度，按机械泵开关  $K_7$ ，约 5 分钟后表  $S_3$  指示  $10^{-4}$  uA，开冷却水源，按扩散泵开关  $K_8$  约 30 分钟， $S_8$  指示为 175uA。

(3)调整合轴：

①加高压：

把电表选择开关  $K_4$  拨向电子束，灯丝电流电位器  $R_{80}$  调到零。按电源开关  $K_9$ ，经 30—60 秒后  $K_9$  指示灯亮。把高压选择开关  $K_2$  拨向 50 千伏档，按高压开关  $K_6$  表  $S_6$  指示为 42uA，拨 80 千伏档指示 6.7uA(66—67uA)。

②粗调照明系统：

顺时针旋灯丝电流电位器  $R_{80}$  约 180°，电子枪灯丝亮。把各光阑和样品移出视场，目测枪体各部并调整使其机械对中。

间断地按投影镜开关  $K_{12}$ ，观察荧光屏上亮斑扩散聚拢是否均匀，调趾极调整螺帽，使之满足要求。

按聚光镜开关  $K_{10}$ ，改变聚光镜电位器  $R_{94}$  观察屏上亮斑在聚焦和散焦状态中心是否在屏中央。如不在中央，可用照明系统平移调整螺钉，调毕检查灯丝像(调  $R_{80}$  使灯丝不饱合即可出现灯丝像)改变  $R_{94}$  视灯丝聚焦和散焦情况，如有问题即为灯丝与栅极帽对中对不好或灯丝变形，需重新调整或更换灯丝。

③粗调照明系统与物镜合轴(详细过程略)

④中间镜、物镜与投影镜合轴。

⑤调解电流中心和电压中心，与此同时加人物镜光阑于视场中心。

(4)消像散：只有把像散消到小于一定程度才能经常获得好照片。

(5)观察衍射图谱。

(6)当测试检查调节正常以后，将事先制作好的超薄切片，连同铜网放入样品台，抽真空后即可调清物象，从观察窗上进行仔细观察。

(7)拍照：

把装有底片的照相盒装入照相室内抽真空。若在开机前装片，步骤同(2)抽真空，抽真空完毕后，即可拍照，用揭开快门手柄即可使底片曝光。曝光时间一般的 2—7 秒。拍摄后取出进行冲洗印放，其步骤与一般冲洗印相相同。

(8)关机过程：

观察结束后，关机按如下进行，首先将灯丝加热电位器( $R_{80}$ )逆时针旋到另位。按高

压开关(K<sub>5</sub>)切断高压。按电源开关(K<sub>9</sub>)切断电子管灯丝和屏压电源。按扩散泵开关(K<sub>8</sub>)切断扩散泵电源,约过 20 分钟后,将 V<sub>2</sub>三通真空阀转向全封闭位置,按机械泵开关(K<sub>7</sub>)切断机械泵电源,关闭水源及切断总电源。

### 3、扫描电镜

扫描电子显微镜是 60 年代以来的一种新型的研究工具,由于它有获得有真实感的立体图象,放大范围广,样品制备操作简便。还可以利用样品在入射电子作用下产生不同信号,对样品进行成分和元素分析。因此,近几年来已广泛地应用于生物科学的各个领域。本实验通过参观示范。使学员对扫描电镜的工作原理、操作过程样品制备及其应用等有个初步了解。

本实验是以参观示范的方式进行,具体内容待与有关单位电镜工作人员商定,并由他们讲授和演示。这里提示几个问题,供参观时参考:

(1)原理: 利用电子枪产生的电子,经过电磁透镜会聚成很小的电子束,并且使电子束在样品上进行扫描,当电子束冲击到样品时,加速的电子与样品相互作用,使样品上产生各种电子,其中用来成像的主要是二次电子(次生电子),经过收集放大,在显像管的荧光屏上出现了样品影像,因为电子束在样品上扫描成像,所以称此类显微镜为扫描电子显微镜。

(2)组成: 无论按功能还是结构都分成下述三部分:

①产生电子束的电子光学系统: 包括电子枪、电磁透镜和扫描线圈。即由电子枪发出的电子束,在加速电压和三个电磁透镜的作用下,逐级被缩小成为直径只有 50Å<sup>0</sup>的电子束,聚集到试样表面上。同时由扫描线圈造成一个不断变化的电磁场,按一定顺序改变电子束偏斜的方向和程度,使电子束在样品表面做光栅扫描。

②样品室: 它是电子束与样品发生作用的场所,样品安置在样品台上,样品台可平移和旋转。

③信号的收集、处理和显示系统: 二次电子经聚焦加速后打到探测器上,形成二次电子信号,探测器中的闪耀体把它转换成光信号→光电倍增管和放大器又变成电压信号→最后被送到显象管的栅极上。由于显微管中电子束在荧光屏上的扫描与电子探针在样品表面的扫描是完全同步的,这样我们可以从荧光屏上得到与样品表面完全对应的放大图象。

(3)样品制备:

扫描电子显微镜观察时有两点要求。一是为了进行表面形貌的观察,就要保证样品尽量不改变生活时的立体形态;二是为了获得必要的衬度,就要使样品表面具有发射二次电子和反射电子的良好性质。满足这两点要求,就在于样品制备中的干燥和喷涂处理。

①干燥: 样品经过清洗、固定和有机溶剂脱水后,就进行干燥。干燥方式有多种,目前以临界点干燥法为最常用。

②喷涂(喷镀): 供扫描电镜的表面应是导电的,而绝大多数样品本身又不导电,因此通常用炽热的钨丝在其空中将金属蒸发,金属微粒落到样品表面,就形成一层薄薄的金属层。它不仅使样品导电,并能改善样品表面反射电子的能力。

样品具体的制备方法很多,有物理的方法,化学的方法,有的不经处理的样品直接观察等。这里仅举水稻花粉发育的实例说明样品制作过程。

a 材料用 6%戊二醛磷酸缓冲液固定约 2 小时或更长。

b 用 0. 1M 磷酸缓冲液冲洗，约 2 小时或更长。

c 经碘化钾溶液(视碘反应情况)。

d 用双蒸水水洗多次。

e 脱水则 50%→100%的甘油脱水，可放冰箱保存备用。

观察时将材料固定在涂火棉胶的支架上，用喷镀机喷镀薄层黄金，即可取出观察。

#### 4. 绒毡层及小孢子发育的扫描电镜样品制备

在植物胚胎学研究方面，Blackmore 和 Baenes 用 ODO 法研究了花粉的个体发育及成熟花粉粒中雄性生殖单位(male germ unit)的结构。陈室理等用此方法制备了几种植物花粉样品，成功地观察了花粉壁的层次、结构及花粉内细胞器亚显微结构等。本实验以木兰科 Magnoliaceae、菊科 Compositae 几种植物为材料，用 ODO 法制备并观察绒毡层及小孢子发育过程，为用扫描电镜研究植物的细胞结构探索新的技术途径。

具体方法如下：

实验用白玉兰 (*Magnolia denudata*) (*Chrysanthemum sinense*) 及花丽 (*Dahlin Pinnata*)采自华中农业大学校园及中国科学院武汉植物研究所植物园。

将不同发育时期的新鲜雄蕊置 pH7. 41 / 15mol 磷酸缓冲液配制的 1%饿酸中于 4℃固定 1--2 小时。缓冲液洗，再经 15%、30%二甲基亚砷(DMSO)转入 50%DMSO 中放置 30 分钟，样品以液氮冷冻，小锤及刀片割断，断块于 50%DMSO 内解冻后，缓冲液洗净，于 0. 1%饿酸中于 4℃放置 2 周，再于 1%饿酸中固定 1 小时，清洗后将样品置 2%丹宁酸中 16 小时，缓冲液充分洗净，最后再于 1%饿酸中固定 1 小时，逐级丙酮脱水，临界点干燥，镀金属膜，日立 S-450 型扫描电镜观察。

#### 5. 一种花粉原生质体电镜制样技术

花粉原生质体是细胞工程与生殖生物学研究中的一种优良的实验体系。最近，花粉原生质体分离与培养，包括启动细胞分裂与萌发花粉管均有新的进展，在此基础上，我们开展了超微结构的研究。花粉原生质体电镜制样有两个要求：第一，花粉原生质体十分柔嫩，有的具大液泡，有的含丰富的储藏物质，需要注意细致地保持其超微结构不受损伤。

第二在目前花粉原生质体培养诱导分裂频率偏低的情况下，需要注意在操作过程中减少材料的丢失，并且能够做到有目的地挑选少数有用的培养材料，提高工作效率。显然，按常规组织块的制样技术是不合宜的。我们参考了前人关于花粉原生质体与体细胞原生质体制样品的基本流程；又借鉴 Scott 等用琼脂包埋法解决超薄切片中球形材料的定向问题和 Lancdille 等用琼脂糖预包埋被子植物雄蕊毛加固柔软材料的方法，试验了琼脂预包埋与预先挑选材料两个关键步骤，较好地达到了，上述两方面的要求、建立了适于花粉原生质体的制样技术，先后在唐菖蒲(*Gladiolus gandavensis*)、萱草 (*Hemerocallis fulra*) 和鸢尾 (*Iris tectorium*)花粉原生质体及其培养材料进行超薄切片，获得了较好结果。现将具体流程介绍如下：

##### ①固定

用培养基配制 0. 5%、1%和 2%三种浓度的戊二醛固定剂。在室温条件下，先将花粉原生质体培养悬浮液移入离心管，将 0. 5%戊二醛固定液沿着离心管边缘缓缓加入，直至与培养悬浮液体积大致相等，并轻轻混匀；20 分钟后离心弃去部分上清液，加入与



之等量的 1%戊二醛固定液，20 分钟后；再投入 1%的戊二醛 1 小时；2%戊二醛 1—2 小时。

固定后，用培养基洗涤一次，再用 0.05M 的磷酸钠缓冲液 (pH6.8) (0.1MNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>1 份，0.1MNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>1 份，蒸馏水 2 份。离心洗涤三次，每次 15 分钟。

再用同一缓冲液配制的 1%锇酸溶液后固定，置冰箱过夜(11—15 小时)，次日用同样的缓冲液换洗 2 次。此时花粉原生质体呈现褐色。

除必要操作外，固定以后所用溶液均应事先在冰箱中冷藏，材料亦应尽量放置在低温条件下。

#### ②琼脂预包埋与材料选择

将已熔化的 1%纯化琼脂冷却到 35—40℃，迅速与材料轻轻混匀，立刻平铺在洁净的载玻片上，琼脂厚度约 1mm。琼脂凝固后，立即以倒置显微镜下挑选所需的材料，如培养后萌发的花粉管、二--四胞原胚以及多细胞团等。在被选择的细胞旁划上 1.5mm<sup>2</sup> 大小方框，作好标记。用双面刀片将划好的小方块挑出，置于 0.05M 磷酸钠缓冲液中。

需要注意的是，挑选材料往往需要较长时间，应十分耐心。如果材料太多，为了防止琼脂失水干结，可将载玻片放在垫用湿滤纸的培养皿中。一般在室温下可以放置 4--6 小时，未经培养的花粉原生质体群体均匀一致，在琼脂预包埋后，不必挑选，可直接用刀片划成 1.5mm<sup>2</sup> 左右的方块备用。

#### ③脱水

脱水从 10%乙醇开始，约每 15 分钟乙醇浓度递增 10%，逐渐把材料转移到无水乙醇中，再换三次后置冰箱过夜。次日换一次无水乙醇，以保证彻底脱水，经无水乙醇与环氧丙烷等量混合液过渡一次，再换二次环氧丙烷，每次约 15 分钟。

刚刚包埋的琼脂小块含有很多水份，很柔软，易碎。在脱水过程中需要特别小心。直到脱水完成，琼脂便变得富有弹性。脱水过程与固定后的洗涤过程相似，尽量将材料和配制的溶液放在冰箱中，使整个脱水过程保持在相对的低温条件中。

#### ④渗透与包埋

自渗透开始，所有步骤均在室温下操作。环氧树脂为 Araldite (Durcupan ACM Fluka)。配好的环氧树脂可置冰箱保存。琼脂块经下列溶剂渗透，环氧丙烷与环氧树脂(按 3: 1: 1: 1: 1: 3 的体积比例)的混合液依次渗透各 4—6 小时，在环氧丙烷与环氧树脂的 1: 3 混合液中可以过夜。纯环氧树脂渗透约 2 天。将琼脂块转入橡胶平板中包埋。聚合时温度从低到高：37℃，45℃，50℃条件下各 12 小时，60℃下 48 小时。此时包埋块透明呈浅黄色，质地坚硬。

综上所述，整个固定、脱水、包埋过程可在 7—8 天完成，得到聚合好的包埋块。

#### ⑤切片与染色

将包埋块对着灯光，寻找琼脂块的位置，用刀片修去琼脂块边缘多余的环氧树脂，再用玻璃刀切出光滑平面，确定花粉原生质体的位置，最后在确定的花粉原生质体周围修出边缘整齐的梯形平面，进行常规的超薄切片。

染色方法与常规超薄切片双染法相同，醋酸双氧铀—柠檬酸铅双重染色。染色时间因材料而异，一般约为 25--30 分钟。染色后的铜网便可置于电子显微镜下观察。

应用上述技术，我们得到了花粉原生质体及其培养材料的良好图象，

值得注意的是以几个技术关键：1、分次固定、逐级脱水、缓慢渗透以及渗透前的低温条件，特别是等渗培养基配制低浓度戊二醛作为初始固定剂，对于减少原生质体破损，保持内部结构完整是非常重要的。2、琼脂的应用，包括琼脂预包埋和预包埋后材料挑选，不仅减少培养材料在换液操作过程中丢失，而且做到有目的地挑选有用的材料，大大提高了工作效率。

#### 6. 花药绒毡层膜的分离及绒毡层膜用电镜观察的样品制作方法

##### ①分离绒毡层膜

###### a 材料的准备

花药的各个发育时期，从小孢子至成熟时期都能将绒毡层膜分离。如果作为练习这种方法用禾本科植物的花药如小麦、黑麦是很好的材料。分离的花药可先用卡诺氏固定液或福尔马林—醋酸—酒精(FAA)固定液固定，用前以70%酒精洗一次，也可以直接用新鲜的花药分离。

###### b 在醋酸酐—浓硫酸混合液中处理

将准备好的花药置于试管中，加入醋酸酐和浓硫酸(9:1)混合液(配制时注意将浓硫酸逐滴加入醋酸酐中)。溶液约为材料的20倍。然后将装有材料的试管置于水浴中，加热至水沸腾时不再加热。试管在水浴中停留5—8分钟。小麦花药试验用不同的处理时间，3分钟，即可达到分离的目的，材料经处理后由无色变为褐色。进一步用蒸馏水洗涤净。可将材料连同分离液倒在培养皿中，更换3—4次蒸馏水。

经处理后的花药，花药壁层的细胞及花粉的内含物全被溶解掉，只留下抗乙酰解的结构，即只保留绒毡层膜和附于其上的乌氏体以及花粉粒的外壁。发育较早期的花药进行处理时容易获得完整的包含花粉粒的绒毡层膜囊；接近开花时的花药分离处理时，囊易破裂，这有利于得到单层的绒毡层膜片用制成展开的单层膜的制片。这种制片对观察其表面的细微结构效果更好。

##### ②制作供透射电镜测察的样品

在双筒解剖镜下检查分离所得的绒毡层膜。找寻裂开的膜分成边长2厘米的方块。将小片的膜捞到无支持膜的铜网上。置于贴有滤纸的培养皿中。待干燥后，用电镜样品常用的醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色。干燥后即可观察。这种样品在电镜观察中能清楚地显示窗孔状的基质层和乌氏体有连索使支持在窗孔状层上。

##### ⑧制作供扫描电镜观察的样品

将分成小块的绒毡层膜转移至大小约4mm<sup>2</sup>的盖玻片上(一般的盖玻片用钻石笔裁小)。以空气中干燥，经真空喷镀后即可观察。在扫描电镜下显示的乌氏立体图形特别清楚。

## (十一)组织培养方法

### 1. 小麦花药培养

(1)用醋酸洋红涂片镜检，选取花粉处于单核中期的小麦穗子，其外部形态为旗叶下一叶的叶耳之距为10—20厘米(依品种和气候条件而异)。

(2)将叶子剪掉，只留下包裹穗子的叶鞘，用湿纱布包好，罩以塑料袋，或将穗子插

人烧杯中的水中。置于 3℃—5℃ 的冰箱中冰冻预处理 3—5 天。

(3)用脱脂棉球蘸 70%乙醇擦拭叶鞘，在无菌条件下剥取花药，接种到含有 2.4-D 2 毫克 / 升的 N<sub>6</sub> 培养基上，培养基的蔗糖浓度为 6%。

(4)接种好的花药置于 25℃—28℃ 培养室中培养，或先在 33℃ 的温箱中培养 3—5 天，再转到 28℃ 的培养室中培养。培养室中可以不加光照。

(5)当愈伤组织生长到 1.5—2.0 毫米时，将其转移到含有 NAA 0.2 毫克 / 升和激动素 1 毫克 / 升的 N<sub>6</sub> 分化培养基上(蔗糖浓度 3%)，进行根芽分化。转移后的愈伤组织置于加有人工照明的培养室中。培养室的温度以 25℃ 为宜。

(6)当再生植株长出发达的根系之后(注意根不要长的太长)即可由试管移栽至土中。移栽时小心将小苗由试管中取出，用水轻轻洗去根部的培养基，栽入透气良好的土壤中。移栽后浇透水，一周内罩以烧杯保持湿度。影响小麦花粉植株移栽成活的主要因素是温度，夏天高温季节很难成活，而在秋季凉爽气候下移栽成活率很高。

(7)为了避开高温季节移苗，可在愈伤组织转移到分化培养基上之后，置于 5℃ 的冰箱中，至少可贮存两个月，愈伤组织的分化能力并不受影响。两个月后将愈伤组织转移到新配制的分化培养基上，进行根芽分化。

(8)当花粉植株处于分蘖盛期时，就可进行染色体人工加倍。将植株从土中挖出，洗去泥土，浸入 0.02% 的秋水仙碱水溶液中(注意一定要使药液没过分蘖节)，于 10℃—15℃ 的散射光下处理 2—4 天，然后洗去药液，栽入土中。

## 2. 一种高效的小麦花药培养新方法

### (1)母液的配制

①大量元素母液(10 倍量，见表 1)。分别称取 10 倍所需量的各种大量元素的无机盐，依次溶于约 800ml 热的(60—80℃)重蒸水中。注意一种盐溶解后再加入下一种盐。最后加水至 1000ml，冷却后贮存在冰箱中。

②铁盐母液(32mg / ml)。称取乙二胺四乙酸铁钠(Ethylene-tetraacetic acid ferric-sodium salt, Fe-Na<sub>2</sub>EDTA)1280g，溶于约 150ml 水中，最后定容至 200ml。

③微量元素母液(1000 倍)。分别称 1000 倍用量的微量元素的盐，依次溶于约 800ml 水中，定容至 1000ml。

④有机附加物母液(100 倍)。分别称取 100 倍用量的各种有机附加物(见表 1)，依次溶于约 800ml，定容至 1000ml。10ml 母液中含 1000ml 培养基所需有机附加物。将此母液分装到塑料管中，每管 10ml，加盖后贮存于冰箱的冷冻室内贮存备用。用此法可长期贮存母液。

⑤2,4-D 母液(0.5mg / L)。50mg 2,4-D 用大约 2ml 95%乙醇溶解，加水至 100ml，贮存于冰箱中。

⑥激动素母液(0.5mg / L)。50mg 激动素用大约 2ml 1M 盐酸(或 1M NaOH)溶解，加水至 100ml，贮存于冰箱中。

⑦肌醇、谷氨酰胺和葡萄糖均匀母液，在配制培养基时直接称取所需用量加入。

### (2)花粉胚诱导培养基的制备(1L 体积)

①在 1L 的烧杯中加入大量元素母液 100 ml，微量元素母液 1 ml，铁盐母液 5ml，有机附加物母液 10 ml，2,4-D 母液 1 ml 和激动素母液 1 ml。

表 1 小麦花药培养基(Chu et al. , 1990)

成 分                    mg / L		母液浓度	②
KNO <sub>3</sub>	1415	大量元素母液，10 倍	加入肌醇物母液 300mg，谷氨酰胺 1000mg 和葡萄糖 37.8g 和适量水到上述烧杯中。
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	232		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200		
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	83		
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	93		
Fe-Na <sub>2</sub> EDTA	32	铁盐母液，32mg / ml	③ 定溶至 1000ml，调 pH 为 5.4。
ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	5	微量元素母液，1000 倍	
MnSO <sub>4</sub> • 4H <sub>2</sub> O	5		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5		
KI	0. 4		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0. 0125		
CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	0. 0125		④ 用过滤消毒装置消毒，滤膜孔金经 0.45u。
CoCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	0. 0125		
Glycine	1. 0	(3) 花药接种与培养	
Thiamine HCl	2. 5		
Pyridoxine HCl	0. 5		
Nicotinic acid	0. 5		
Biotin	0.25		
Calcium pantothenate	0. 25	① 在超净	
Ascorbic acid	0. 5		
MyO--Inositol	300		不需母液
Glutamine	1000		
Glucose	37800		
2, 4—D(植株再生时去除)	0. 5	2, 4—D 母液，0. 5mg / ml	
Kinetin(植株再生时去除)	0. 5	激动素母液，0. 5mg / ml	
pH5. 4			

工作台中将上述无菌培养液，用吸管分别装到 35×10mm 的小培养皿中，每皿 2.5 ml。

②采集打苞期的麦穗包裹在旗叶鞘内。可根据镜检结果确定花粉单核中期的植株的形态，然后采取。

③在超净工作台内小心地除去旗叶鞘，用无菌镊子去颖壳，镊取花药放在培养液表面。每培养皿 60-80 个花药。

④盖上培养皿，用石蜡膜封口

⑤在 28—30℃培养室中培养，黑暗或给以如弱的日光灯照，25 天后可以观察到花粉

胚出现，培养 35-40 天时将胚状体连同花药转入植株再生培养基。

(4)植株再生培养基的配制 采用固体—液体双层培养基，成分如表 1，但不含 2，4—D 和激动素。

①固体层(500 ml 体积)

a 在 200 ml 烧杯中加入大量元素母液 50 ml，微量元素母液 0.5 ml，铁盐母液 2.5 ml 和有机附加物母液 5ml，再加入肌醇 150 mg，谷氨酰胺 500mg 和葡萄糖 18.9g，定容为 200ml，过滤消毒。

b 向 500 ml 三角瓶中加入 4g 洋菜和水 300 ml，调 pH5.6，在 15 磅压力下高温消毒 15 分钟。

c 在 b 部分冷却到 60℃左右时，将其与 a 部分混合，摇均，分装到 60×20 u 培养皿中，每皿约 15 ml。

②液体层(200ml 体积)

在烧杯中加入大量元素母液 20ml，微量元素母液 0.2ml，铁盐母液 1ml 和有机附加物母液 20ml，再加入肌醇 60 mg，谷氨酰胺 200 mg 和葡萄糖 7.56g，加水定容至 200ml，调 pH 为 5.4，过滤消毒。

③双层培养基

向上述装有固体培养基培养皿中加入液体培养基，每培养皿加入 3ml。

(5)由花粉胚再生植株

将花粉胚连同花药转移到双层培养基上，在光下培养 5 天以后，陆续有花粉植株形成。待植株生长健壮并具备根系时即可移栽。

3. 菸草花药培养

(1)取花萼与花冠等长的菸草花蕾，并用醋酸洋红涂片确定其花粉发育时期。选用花粉处于单核晚期(单核靠边期)的花药进行接种。

(2)将花蕾剥去萼片先用 70%的乙醇浸泡 10 秒钟，再用饱和漂白粉上清液浸泡 15—30 分钟，最后用无菌水冲洗 3 次。

(3)在无菌条件下，剥去花冠，将花药接种到含有 1%活性炭的 H 培养基上，培养基中的蔗糖浓度为 3%。如果在培养基中加入 0.1—0.5 毫克 / 升的引哚乙酸，则有助于花粉胚状体的形成。接种好的花药于 26—28℃的加有适当光照的培养室中培养。

(4)接种后三周左右药室开裂，在裂口处可见乳黄色的胚状体，见光后很快变绿，然后逐渐发育成单倍体小苗。当小苗长有 3--4 片真叶时，可进行染色体加倍。将经过灭菌的 0.4%秋水仙碱水溶液在超净台上倒入培养瓶中，浸泡小苗 24—48 小时。倾出药液，用无菌水洗三次，再将小苗分株移栽到 T 培养基上。

(5)在 T 培养基上小苗生长很快，当小苗长出发达的根系时，就可移出试管，轻轻洗去琼脂，移栽到花盆中。移栽后一周内用烧杯将小苗罩起，保持湿度，有利成活。

4. 单花粉培养的方法

单花粉培养的整个程序可分为单花粉分离和单花粉培养两大部分。

(1)单花粉分离

①直接压挤 在液体培养基中用平头的玻璃棒反复挤压花药，挤出花粉后用镊子将花药空壳取出，此法优点是操作简便，缺点是花粉中混杂有体细胞并且所得悬浮液中花粉密度不会很高。

## ②压挤一过筛一清洗

a 压挤：将花药(按花药的大小，大的可以几个，小的可以几十个)从花蕾中分离出来以后放入小烧杯中，加入一定浓度的蔗糖液，用注射器内管轻压花药挤出花粉。

b 过筛：将上面得到的花粉与药壁渣的混合液，通过细胞筛(孔径应比花粉粒大10 微米左右)流入离心管，于是大块药壁残渣被留在网上，离心管中含有花粉与小块药壁残渣。

c 清洗：离心管中液体被置于 200 转 / 分速度下离心使花粉粒沉淀，小块药壁残渣留在上清液中。吸出上清液重新加入蔗糖液，振荡使离心管中花粉悬浮，再离心弃去上清液。重复 3—4 次，最后一次用液体培养基代替蔗糖液。

d 接种：在最后一次上清液吸出后加入一定量的液体培养基，用血球计数板计数，使花粉密度达到  $10^5$  个 / 毫升左右。此法操作较为复杂，但得到的花粉很纯净，密度可以很高。

## (2)单花粉培养

### ①直接培养

a 从未经任何预培养新鲜花药中分离出单花粉，接种到合成培养基中进行培养。这个方法能诱导某些裸子植物的花粉形成愈伤组织。

b 在培养基中补充花药提取物，然后接种花粉进行培养。这种培养基实际上是一种条件培养基。花药提取物的制作方法是：先将花药接种在合适的培养基上培养一个星期，然后将可以有花粉分裂的花药取出浸泡在刚煮沸的水中(密度是每毫升 10 个花药)，用研钵研碎，倒入离心管，高速离心后取出上清液就是花药提取物。提取物被过滤灭菌后加到培养基中，浓度随种的不同而异，对于烟草来说是每毫升培养基 5 个花药。在培养基中补充了花药提取物后，再将单花粉接种进去培养。这个方法能将烟草、曼陀罗的单花粉诱导形成植株。

### ②哺养培养

a 将在合适的培养基上培养裂开的花药(这种花药可以是另一种植物的，但这种花药的诱导频率应该比较高的)作为一种哺养组织，将需要培养的单花粉接种到这种花药里，进行哺养培养。运用这种方法能将接种在矮牵牛花药中的烟草花粉粒诱导形成植株；

b 将花药先接种到合适的培养基上作为哺养组织，然后在花药上部放一小片滤纸，在滤纸上接种单花粉(与花药是同一个种)进行培养。这个方法能够诱导蕃茄的花粉形成单倍体无性系，但未诱导形成植株。

在单花粉培养中，还有一种叫微室培养的方法，它是将单花粉接种到载玻璃上制作的一个微室的培养基中进行培养。运用这个方法已见到诱导油菜单花粉启动形成细胞团的报道。

## 5. 烟草单花粉培养植株的过程

将花粉发育时期为单核晚一二核初期的“革新一号”烟草花蕾置于  $3^{\circ}\text{C}$  处冷处理 72 小时，然后经无菌操作取出花药接种于尼许(Nitsch)H 培养基上，在  $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$  的光照条件下培养 3 天，接着用压挤一过筛一清洗的方法分离出花粉，接入液体培养基。液体培养基的成分是(毫克 / 升)：硝酸钾 950，硝酸铵 720，硫酸镁( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )180，磷酸二氢钾 68，氯化钙( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )166，谷氨酰胺 800，丝氨酸 100，肌醇 5000，蔗糖 30000，铁盐溶液(7.45 克  $\text{Na}_2\text{—EDTA}$  和 5.57 克硫酸铁，溶于 1 升水中)每升培养基用 10 毫升，

pH5.8, 过滤灭菌, 用血球计数板计数, 使花粉密度达到  $7 \times 10^5$  个 / 毫升, 以每瓶 1 毫升的量分装入 20 毫升的锥形瓶中, 在  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , 弱的散射光照下进行静止的薄层液体培养。

#### (1) 花粉细胞脱分化形成细胞团

花粉粒在液体培养基中培养 5—10 天后, 发生了明显的细胞学变化。培养中存活的花粉中有少数明显长大, 细胞质逐渐变浓, 花粉外壁的沟纹变得不明显, 接着开始了脱分化过程中的第一次有丝分裂, 花粉被等分为外形上相似的两个细胞。随着分裂的不断进行, 花粉粒逐渐发育成为花粉细胞团。花粉细胞团长大, 花粉外壁破裂, 细胞团从花粉中释放出来, 直接接触培养基。

#### (2) 细胞团发育成胚状体

花粉粒经 20—30 天培养后, 便可观察到由多细胞团分化形成各种类型的胚状体。有球形的、心形的、鱼雷形的和子叶形的。

#### (3) 胚状体发育成烟草小植株

将子叶形的胚状体转移到尼许(Nitsch)H 的固体培养基上, 一星期后即形成具有根和两片幼叶的小苗, 小苗进一步长大后转移到土壤里长成小植株。

### 6. 未传粉子房的离体培养

关于未传粉子房的离体培养, 五十年代已有人进行许多探索, 如葱莲、蜀葵、罂粟和洋葱等植物培养都没有获得成功; 在玉米子房培养中获得了愈伤组织, 但只分化根; 在油菜子房培养中诱导出了小植株。近几年来, 由于花药培养取得了较大的进展, 但在许多植物上, 诱导花粉植株的频率较低或不能诱导出花粉植株, 从而影响到花粉单倍体育种方法的应用, 因此国内外有不少人开始探索从未传粉子房诱导单倍体植株这一途径, 并在水稻、烟草、大麦、向日葵等植物上取得成功。在雌配子体发育过程的机理方面进行了许多研究, 取得较好的结果。

在未传粉子房的培养工作中, 对培养植物的差异, 接种时胚囊发育时期, 单倍体愈伤组织和胚状体的来源等方面进行了许多研究。

#### 培养方法

##### (1) 材料的选择与消毒

在未传粉子房培养中, 材料一般选用在开花前 1--5 天, 选取子房进行离体培养, 在一些禾谷类植物可以根据叶的发育状态, 如旗叶和幼功能叶的叶环距离以及胚囊发育时期与花粉的相关性来选择正确的培养时期, 以达到较好的培养效果。

材料消毒, 在禾谷类植物中, 由于颖花严密包裹在叶鞘里, 因此不需要药剂进行消毒, 只在幼穗表面经 70% 酒精擦拭消毒。在无菌条件下剥开幼花, 用镊子夹出子房进行接种, 子房平放在培养基上。双子叶植物的花蕾可以饱和漂白粉灭菌 15 分钟, 无菌水冲洗三次, 就可在无菌条件下进行接种。

##### (2) 培养基

各种植物未传粉子房培养所用的培养基, 因植物的种类不同而不同。现将以下几种植物的培养基例举如下:

① 水稻基本培养基为  $\text{N}_6$ , 附加 2 毫克 / 升的 2, 4-D, 500 毫克 / 升的酪朊水解物, 以及 4% 蔗糖。液体培养比固体(加入 0.8 琼脂)培养效果好。分化培养基为  $\text{N}_6$ , 附加 2 毫克 / 升的激动素, 0.5 毫克 / 升的萘乙酸, 500 毫克 / 升酪朊水解物的 3% 蔗糖以及



0.8%琼脂。

②大麦基本培养基为 N<sub>6</sub>，附加 0.5 毫克 / 升的 2, 4-D，2 毫克 / 升的萘乙酸，1 毫克 / 升的激动素，3% 的蔗糖。分化培养基为去掉诱导培养基中的 2, 4-D，加入 0.5% 的活性炭，琼脂为 0.8%。

③青稞基本培养基为 N<sub>6</sub>，附加 2 毫克 / 升的 2, 4-D，4 毫克 / 升 6-BA，5—6% 蔗糖，0.65% 琼脂。

④百合基本培养基为 N<sub>6</sub> 或改良 MS 培养基，附加 4 毫克 / 升 2, 4-D，1 毫克 / 升的激动素或 4 毫克 / 升 6-BA，6—8% 的蔗糖和 0.8% 琼脂。分化培养基为 MS，附加 1 毫克 / 升 2, 4-D，1 毫克 / 升的萘乙酸，4% 蔗糖和 0.8% 琼脂。

⑤向日葵基本培养基为 N<sub>6</sub>，附加 2 毫克 / 升 2 甲基-4 氯苯氧乙酸，6% 蔗糖。液体培养基上漂浮培养。30 天后转移到附加 2 甲基-4 氯苯氧乙酸和加入 2 毫克 / 升 BA 的分化培养基上。

### (3) 品种差异

水稻、小麦、大麦、烟草、向日葵等未传粉子房的培养中，经研究表明：诱导产生单倍体的频率与植物种和品种具有很大差异，也就是说其成功百分比与基因型有关。如水稻传粉子房培养中，龙晚×IR<sub>2</sub> 杂种一代诱导胚状体或愈伤组织频率可达 2.81%；而红 410×IR<sub>2</sub> 杂种一代诱导频率仅 0.8%。说明不同杂交组合其诱导频率是不同的。

### (4) 胚囊的发育时期

接种时未传粉子房的发育时期，也即胚囊的发育时期和诱导频率有密切关系。从研究得较多的大麦和水稻来看，在胚囊各时期都可以诱导，而以接近于成熟的胚囊时期易于诱导成功，我们在水稻中观察到胚囊四核期到成熟胚囊时期其诱导频率最高。胚囊处于单核期，这时花粉处于单核中期，没有看到子房被诱导。所以选择合适的子房发育时期是诱导成功的关键因素。大麦子房培养中在开花前 1—2 天取下子房培养诱导效果最好。

## 7. 胚乳培养

### (1) 猕猴桃的胚乳培养

①材料和培养条件试验材料为中华猕猴桃(*Actinidia Chinensis* Planch Var. *Chinensis*) 和硬毛猕猴桃(*A. Chinensis* Planch Var. *hispida*)。猕猴桃的胚乳发生为细胞型。6 月下旬至 7 月中旬为胚乳旺盛生长期，通常已达到成熟时的大小。采集幼果用 70% 酒精表面杀菌，再以自来水洗 1—2 次，用 8—10% 安替福氏或饱和漂白粉水溶液灭菌 20—30 分钟，无菌水清洗。

接种时在无菌条件下切开幼果，在解剖镜下取出种子。小心地分离出胚乳，胚乳为半透明，富弹性。胚呈长窄条状包埋其中，只需用镊子轻轻压胚乳合点一端，胚即由胚乳珠孔端挤出，所得到的大块胚乳接种于下列培养基中。

培养基共分 8 组：(1)MS；(2)MS+玉米素 1ppm；(3)MS+玉米素 3ppm；(4)MS+玉米素 3ppm+NAA0.1ppm；(5)MS+玉米素 3ppm+NAA0.1ppm+CH400ppm；(6)MS+玉米素 3ppm+2, 4-D 0.5—1ppm；(7)MS+玉米素 3ppm+2, 4-D 0.5—1ppm+CH400ppm；(8)MS+2, 4-D 1ppm。每种培养基中含蔗糖 2%，pH 5.8—6.0。按一般植物组织培养高压灭菌。

培养物置 16℃(夜间), 28℃(白天)的培养室下, 白天除室内散射光照光, 另加人工光照, 光强度约为 2000 勒克斯。

②愈伤组织的发生 接种后一周, 1—5 组及 8 组培养基上的外植体无明显变化, 6, 7 两组含有玉米素和 2, 4-D, 可见到白色愈伤组织。其中硬毛猕猴桃愈伤组织诱导频率为 87.9%, 中华猕猴桃的 56%。

大约 15—20 天, 2—5 组培养基上的外植体, 表面出现凸出的乳白色瘤突, 继之转绿, 伸展成丛状的叶状体。如此从状体转至含 1ppm 玉米素 MS 培养基上, 即可分化出少许芽。6, 7 两组培养基上的愈伤组织, 在半月后增殖旺盛, 直至一月后趋于稳定。

③胚状体及植株的分化 将处于旺盛生长期的愈伤组织(大约接种后 15 天), 即时转入 MS 十玉米素 1ppm+CH400ppm 的培养基上, 大约半月后, 即在愈伤组织团块的内部分化出胚状体并形成完整小植株, 突出愈伤组织团块表面。

待胚乳小植株生长到具 4—5 片小叶后即可移栽到盛有土壤的小盒中或者进行嫁接。

④胚乳植株形成的组织学观察和根尖染色体检查将 6、7 两组培养基上的愈伤组织块和转入分化培养基半月后的愈伤组织块, 分别固定于 FAA 中, 按一般显微技术制片染色, 可观察到愈伤组织的早期发生过程和愈伤组织块内部发育程度不同的各种胚状体。

切取植株根尖, 将其浸泡在饱和对二氯代苯水溶液中 4 小时, 流水冲洗 5—10 分钟, 用卡诺氏液固定。经 1NHCl, 60℃保温 10 分钟, 而后用醋酸洋红染色、压片、镜检结果表明猕猴桃胚乳植株根尖细胞除少量是三倍体外, 多数是多倍和非整倍的。不过, 用对二氯代苯处理后, 染色体收缩程度仍不很满意, 影响观察和计数, 因此, 还有待改进。

## (2)大麦的胚乳培养

①材料制备 试验材料为普通大麦早熟品种, 采取开花后 4--5 天和 7—12 天的幼穗, 剥去颖片, 用 70%酒精浸泡 1 分钟, 再用 8%安替福民灭菌 10 分钟, 无菌水冲洗数次。然后在解剖镜下小心剥去种子外部的果皮和紧贴胚乳的种皮, 珠心等组织, 最后自珠孔端切去幼胚, 其余胚乳部分接种在诱导愈伤组织的培养基上。

②供试培养基为三组: (a)MS+2, 4-D1ppm+水解干酪素(CH)50ppm; (b)MS+茶乙酸(NAA)0.2ppm+CH500ppm; (c) MS+NAA0.2ppm+激动素 0.5ppm。所在培养基中均加入 6%的蔗糖, 0.8 琼脂, pH5.6, 高压灭菌。

③愈伤组织的形成和植株的分化受精后 4—5 天的胚乳, 在上述三种培养基上均未形成愈伤组织, 10—12 天在(a)号培养基上产生了愈伤组织, 在(b)、(c)号培养基上同样没有反应。

将(a)号培养基上的愈伤组织, 转移到(c)号培养基上, 部份愈伤组织块(约 10%)转绿, 同时分化出具根、茎、叶的完整植株。有趣的是植株中有绿色的白色的, 和两色相嵌的。

④植株倍性检查 使用上述方法, 对部分胚乳植株根尖进行染色体镜检, 结果表明, 除少数 3n 细胞外, 多数为 7.14 和 28 等整倍性和非整倍性细胞。

## 二、植物胚胎学实验指导

### 实验一 植物界的有性生殖与世代交替

### (一) 目的

植物在进化中,其有性生殖是由原始的类型演化的进化类型。低等植物(藻类, 菌类和地衣)的生殖器官为单细胞结构, 合子发育时离开母体不形成胚, 属无胚植物; 高等植物(苔藓、蕨类、种子植物)的生殖器官进化为多细胞结构, 均行卵式生殖, 合子在母体内发育形成胚, 这类植物被称为有胚植物。

在高等植物中, 苔藓、蕨类和裸子植物, 它们胚胎蕴育于颈卵器之中, 而被子植物的胚和胚乳是由胚囊里的卵和极核通过双受精作用而形成。胚囊位于胚珠中, 而胚珠又包被在子房内, 这类植物是最进化类型。本实验目的在于使学生对各类植物的有性生殖有一个概况的了解。

### (二) 材料

水绵、地钱、蕨的原叶体(精子器、颈卵器)、松的雌、雄果纵切片。

### (三) 实验内容

#### 1、水绵

观察水绵的有性生殖制片, 在两条并列的藻丝之间产生接合管, 接合管两边的细胞为配子囊。囊内的原生质团缩为配子。其中一条囊内配子进入相对的藻丝的配子囊中, 并与其中的配子融合形成椭圆形合子。合子休眠后开始萌发, 萌发时不形成胚, 而经过减数分裂产生具有单核细胞, 并由此细胞分裂发育为新的藻体。

#### 2、地钱

地钱为苔藓植物中苔纲植物, 配子体发达呈叶片状, 雌雄异株。

雄配子体的雄托纵切面, 可见雄托上凹生一些由多细胞构成的精子器, 其内形成二条等长鞭毛的精子。

雌配子体的雌托下裂片之间着生着成群的颈卵器, 近成熟时, 颈的顶端开裂, 游动精子进入颈卵器中与卵融合为合子。合子在颈卵器中发育成胚, 并发育为成熟的孢子体。孢子体散发出孢子, 再发育成配子体(叶状体)。

#### 3、蕨类植物

蕨类植物的孢子体发达, 配子体很小呈心脏形, 配子体下面着生许多精子器(位于心形尖端附近)和颈卵器(位于心形凹陷部位)。卵经过受精后形成合子。再由合子发育成胚, 最后成长为独立的(孢子体)植物体。

#### 4、松的有性生殖

松的雌雄配子体共同寄生在非常发达的孢子体上面。孢子体上着生雄球花(小孢子叶球)和雌球花(大孢子叶球)。

雄球花的每个小孢子叶背面生有一对小孢子囊(花粉囊)。在切片的发育不同阶段上, 可见到小孢子母细胞经减数分裂形成具有气囊的小孢子(花粉粒)。小孢子发育为雄配子体, 成熟的雄配子体含有一个生殖细胞, 一个管细胞和两个退化的原叶细胞(营养细胞)。

雌球花的每一个珠鳞向轴面基部着生一对倒生胚珠。胚珠具一层珠被。珠心中部有一个大孢子母细胞, 减数分裂后, 远珠孔的一个大孢子发育为雌配子体。雌配子体中先形成许多游离核分布于四周, 以后向心地形成胚乳细胞(雌配子体一胚乳组织)。胚乳的顶端产生数个颈卵器, 颈卵器中保留一个卵细胞。

传粉后, 经过一段时间花粉萌发, 由生殖细胞分裂形成精子。精子从花粉管进入颈卵器, 与卵结合, 合子再经过一系列分裂过程而形成胚, 成熟种子中只含有一个具子叶、

胚芽、胚轴和胚根的有效胚。

#### 5、被子植物

被子植物的有性生殖是本课重点，各部分内容将分别进行实验。

#### (四)作业：

- 1、绘地钱、蕨的颈卵器，并绘示出孢子体与配子体的生长情况。
- 2、绘出松的雌、雄配子体结构。

## 实验二 小孢子发育及雄配子体的形成

### (一)目的：

1. 了解小孢子和雄配子体的一般发育过程。
2. 各种植物的花粉在形态、大小、外壁纹饰以及萌发孔、沟的数目和形状都是固定，具有分类意义，研究和掌握花粉的形态特征对于鉴定现代植物、古代化石植物及花粉食疗作用、变态反应、蜂蜜质量分析等均具有重要意义。
3. 花药壁的结构与变化是伴随小孢子发生，雄配子体发育，二者密切相关。本实验在仔细观察花药壁的形成，变化与开裂机制基础上，对进一步了解花药壁对雄配子体的哺育、保护和散粉具有重要作用。

### (二)材料：

小麦、百合、甜菜、醋栗、甘兰、向日葵、西葫芦及茄子等花药切片。

### (三)实验内容：

1. 小麦的小孢子发生及雄配子体发育过程：取不同大小花药，制成切片，由小到大顺序观察。

(1)取幼小花药的横切片，先放在低倍镜下观察，可见到一些略呈方形的花药，仔细观察，花药最外面为一层比较幼嫩的表皮细胞，表皮以内是一些形态相似的薄壁细胞。再换高倍镜观察，可见在花药四个角隅的表皮下方，各分化出一个形状稍大，经向伸长，细胞核较为明显的孢原细胞。有的孢原细胞已开始进行平周分裂，形成内、外两个大小相似的细胞，外边的为初生壁细胞，里面的称为初生造孢细胞。

(2)取稍分化的花药横切片观察：此时可见花药变成四个裂瓣，各分化成一个花粉囊。在每个裂瓣的内部，各有几个染色较深，呈多边形的细胞。它的细胞质较浓细胞核较大，这就是由上面谈的初生造孢细胞进行有丝分裂，发育的次生造孢细胞。在次生造孢发育的同时，外面的初生壁细胞，经平周和垂周分裂，形成同心圆排列的三层壁细胞，与表皮一起构成花粉囊壁。

(3)取稍大一点花药横切片观察：可看到花药已明显地形成四个孢子囊(花粉囊)，每个小孢子囊由药室和药壁两部分组成。再转高倍显微镜观察，其中一个小孢子囊，可见药室内有多个椭圆形的细胞，核大、质浓，细胞外面包有一层胼胝质的壁，这就是小孢子母细胞(花粉母细胞)。此时，花药壁紧靠表皮的一层细胞，开始径向延长，称为药室内壁。紧挨药室内壁一层细胞形状变得扁平，称为中层。药壁最内一层细胞，形状大而显著，细胞质较浓厚，细胞内含有2核至多核，此为绒毡层。

(4)取已分化的花药横切片，可见到药室内的小孢子母细胞正在进行减数分裂，各切

片的时期不尽一致，有的花药内小孢子母细胞处于减数分裂开始，有的经第一次分裂形成两个细胞(二分体)，有的则进行了两次分裂形成了四分体。你观察的切片属哪个时期?

小麦四分体形成的方式属于哪种类型?其排列方式如何?四分体形成后，胼胝质壁很快解体，四分体彼此分开，形成了四个小孢子。每个小孢子均有较浓细胞质，核位于细胞中央，此时为单核花粉粒(小孢子)。

(5)观察接近成熟的花药横切片，可见到单核花粉粒的核作不均等的分裂，大为园形的为营养细胞，小的呈纺锤状的为生殖细胞。生殖细胞逐渐游离于营养细胞的细胞质中，此时为2核花粉粒(雄配子体)。

(6)取已成熟的花药横切片观察：可见二核花粉粒的生殖细胞，经过一次有丝分裂后，形成2个长椭圆形的精细胞，此时花粉粒中逐渐积累大量淀粉一类物质，三细胞型的雄配子体发育成熟，花粉囊开裂，成熟的花粉散出进行传粉。

#### 2. 黑穗醋栗小孢子与雌配子体发育

取不同发育时期花药的切片，仔细观察小孢子和雄配子体的发育过程。并与小麦的小孢子和雄配子体比较有何异同?

3. 取百合、甘兰、西葫芦和茄子等花药切片，鉴别一下：它们处于什么发育时期(小孢子或雄配子体)?

观察以上各切片花粉的形状、大小、表面结构特点及萌发孔数目等特征。

#### (四)作业：

1. 绘出小麦小孢子和雄配子体的发育过程的局部详图，并注明各部分名称。
2. 指出小麦、黑穗醋栗和百合三种植物小孢子母细胞减数分裂分四分体的排列类型、胞质分裂类型、成熟花粉为几细胞型?
3. 绘成熟花粉的形态、绘出幼小和成熟的百合花药的局部详图，并注明花药壁各部分名称。

## 实验三 大孢子的发生与雌配子体发育

### (一) 目的：

1. 了解大孢子及雌配子体的发育过程；
2. 初步了解蓼型胚囊与其他类型胚囊发育过程中的区别。
3. 了解产生种子前身的胚珠一般结构和常见的几种特殊结构。

### (二) 材料：

小麦、黑穗醋栗、百合、向日葵、甜菜、亚麻等切片。

### (三) 内容：

1. 小麦大孢子发生与雌配子体发育：具体观察小麦各个不同发育时期的子房切片。

(1)取幼小子房的纵切片，看到子房室内壁上产生一团细胞，此为胚珠原基的珠心细胞。用高倍镜仔细观察，在珠心的表皮下面，分化出一个形状较大，细胞质浓厚，细胞核明显的孢原细胞。

(2)取已分化的子房纵切片观察：可见珠心表皮下，有一个特大的、略呈长方形的细胞，这就是由孢原细胞分化来的大孢子母细胞(胚囊母细胞)。此时，在珠心外面分化出二层突起，即为珠被的雏形。注意观察大孢子母细胞发生的位置。

(3)取稍后时期的切片观察，可见到大孢子母细胞进行减数分裂时期，判断一下，你观察的切片是处于什么时期?四分孢子是如何排列的?

(4)再取另一片观察，四分孢子进一步变化的情况。即珠孔端的三个细胞逐渐退化，只有近合点端的一个细胞逐渐增大，成为具有功能的大孢子。

当大孢子增大，成为单核胚囊时，内、外珠被发育包围整个珠心，仅顶端留一小孔，即为珠孔。

(5)取接近发育好的子房纵切片，观察单核胚囊进行连续三次分裂的情况，注意你观察的切片是处于什么时期(二核胚囊、四核胚囊或八核胚囊)?小麦的胚囊属于单孢子8核、蓼型胚囊。

(6)观察已发育好的子房纵切片，可看到成熟胚囊的结构，在珠孔端形成一个卵细胞和两个助细胞的卵器，三个细胞呈品形排列，辨别一下，哪个是卵细胞?哪个是助细胞?它们各有什么特点?在合点端形成三个反足细胞的细胞器，仔细观察一下，小麦的反足细胞后期发生什么变化?中央两个极核与大部分细胞质所组成一个中央细胞，这由七个细胞组成的成熟胚囊即为雌配子体。

2. 黑穗醋栗的大孢子发生及雌配子发育过程：观察黑穗醋栗子房各不同发育时期的切片，注意和小麦进行比较，找出其异同点。

(1) 四分孢子呈什么形状排列?

(2) 胚囊属于何种类型?

(3) 成熟胚囊与小麦有何异同?

3. 百合雌配子体发育：观察百合子房不同发育时期的切片(属四孢子八核具母型胚囊)(1)大孢子母细胞时期：在百合子房的横切片上，低倍镜下可见到了房内的中轴胎座上往往着生着6个(或更多)胚珠。找出一个具有大孢子母细胞胚珠，换高倍镜下观察该细胞有何特点?

(2)大孢子2—4核时期：大孢子母细胞进行减数分裂，第一次分裂后不形成细胞壁因而在一个大孢子内有2个细胞核。2核大孢的2核各自分裂一次，形成四个核，即成为四核胚囊，分裂后大孢子核成为1+3排列。即珠孔端有一个核，而合点端有3个排列成三角形。

(3)大孢子核分裂：位于珠孔端一核行正常有丝分裂；位于合点端的三个核分裂时形成的三个纺锤体在合并。

(4)第二次4—核胚囊期：在观察时注意和第一次4核时期比较，核在形态与倍性上有何不同?

(5)成熟胚囊时期：8核胚囊(7胞胚囊)它的结构基本上与黑穗醋栗、小麦成熟胚囊相同，但组成胚囊的某些细胞的大小和倍数是不同的。

(6)取甜菜、黑穗醋栗、向日葵切片观察，哪种是单珠被类型?哪种是双珠被类型?那种有承珠盘?那种有盲囊?那种有珠被绒毡层?

#### (四)作业

1. 绘出小麦成熟胚囊的结构，注明各部名称。

2. 给黑穗醋栗的成熟胚囊结构，并注明各部名称。

3. 填表

项目 植物	珠被 类型	珠心 类型	有无珠被 绒毡层	有无承 珠盘	有无 盲囊
小麦					
甜菜					
向日葵					
黑穗醋栗					
百合					
亚麻					

## 实验四 受精作及胚和胚乳的发育

### (一)目的：

1. 了解被子植物双受精的特点；
2. 了解胚的发育过程；
3. 了解胚乳的发育与类型；
4. 观察外胚乳的来源及特点。

### (二)材料：

番茄、甘蓝、甜菜、黑穗醋栗、荠菜、小麦、百合、向日葵等切片。

### (三)内容：

#### 1. 柱头与花柱的结构及花粉在柱头萌发

(1)分别取甘蓝和小麦的雌蕊制片，可见到柱头的结构特点，注意观察甘蓝的柱头表面的乳突细胞、小麦羽毛状柱头的细胞结构特点。

(2)取甜菜、黑穗醋栗制片，观察花粉粒附着在柱头上及其在柱头上萌发的情况。

(3)取离体萌发的花粉，观察花粉管伸长的部位及精子在花粉管中的动态。

#### 2. 花柱的结构及花粉管在花柱中伸长

(1)取甜菜、蕃茄和黑穗醋栗切片，观察三种切片的花柱，哪种是空心的，哪种是属于实心的？空心花柱的内表皮细胞有何特点？实心花柱中央是何种组织？该组织的特点是什么？

(2)取黑穗醋栗子房纵切切片，观察花粉粒萌发、花粉管进入花柱和子房腔的情况。

(3)取甜菜制片，观察花粉管通过珠孔、进入胚囊(示范)；你观察的切片原胚发育到哪个阶段？



### 3. 双受精作用

(1)取黑穗醋栗切片，在高倍镜或油浸镜头下观察，花粉管破坏一释放出椭圆形的精子与卵细胞靠近，精核进入卵核融合成合子，休眠一段时间后，进行一次横分裂产生2-细胞原胚。

(2)仔细观察，发现在次生极核旁有一精子，在另外切片可见精子与次生极核融合，产生初生胚乳核，进而初生胚乳核进行一次分裂产生2个胚乳细胞。

### 4. 胚的发育

#### (1)取甜菜发育不同时期的切片观察

原胚：经合子分裂产生2分体→四分体→八分体→球形原胚。仔细观察，你观察的切片原胚发育到哪个阶段？

胚的分化：在球形原胚后，其顶端两侧分化较快，形成两个突起的子叶原基、成为心形胚；随着胚轴和子叶的伸长，胚芽和胚根陆续分化出来，发育为鱼雷形幼胚时期。

成熟胚：取成熟胚切片观察，随着胚的分化和长大，使整个胚分化出明显的胚根、胚轴、胚芽和子叶充满了马蹄形的盲囊。

#### (2)取小麦子房切片观察

合子：位于珠孔端，形状的近于圆形，核大、位于中央，细胞质浓厚液泡小。在合子附近的初生胚乳核正在进行分裂。

原胚：合子经过一次横分裂，形成一个顶细胞和一个基细胞。此时在胚囊中有少量的胚乳游离核；以后多次分裂形成多细胞的梨形原胚。此时在胚的附近部分胚乳游离核，开始形成细胞壁而成胚乳细胞，随着胚的增大，胚乳游离核全部形成胚乳细胞。

胚的分化：梨形胚进一步分化，在它的一侧(腹面)出现一个凹沟，以后进一步分化出生长点、胚芽鞘、外胚叶突起等。

成熟胚，取小麦种子制片观察小麦成熟胚的结构特点：胚由盾片、胚芽鞘、胚芽、胚轴、胚根、胚根鞘和外子叶等部分组成。

#### (3)荠菜不同发育阶段胚的切片，观察原胚和胚柄的特点。

### 5. 胚乳的发育过程

(1)取甜菜不同发育阶段的胚乳制片，观察胚乳的变化过程，即在胚囊和盲囊中由初生胚乳核产生游离核，由少到多，达到高峰后，又逐渐瓦解消失。

(2)取黑穗醋栗的细胞型胚乳不同发育阶段的制片，可见初生胚乳核一开始就产生细胞并逐渐由合点端向珠孔端延伸，胚乳发育后期，又在呈“网络”状的胚乳细胞中分裂，呈区域化现象。

### 6. 外胚乳

取甜菜各发育时期的制片，在显微镜下观察，随着胚和胚乳发育的同时，可见到由马蹄形盲囊围成的珠心组织自始至终存在着，而且这部分珠心组织不断积累大量的营养物质，这部分就是外胚乳，仔细观察各时期的结构特点。

### (四)作业(任选)

1. 绘甘兰柱头的横切面，示乳突细胞的特点。
2. 绘番茄和黑穗醋栗花柱横切面示引导组织。
3. 绘一双受精过程中所观察到的片断。
4. 绘甜菜胚发育过程的片断图。

5. 绘黑穗醋栗成熟胚的外形图。
6. 绘荠菜胚发育的片断图。
7. 绘出甜菜不同时期胚乳和外胚乳的特点。
8. 绘出黑穗醋栗胚乳发育早、中、晚期的局部详图。

## 实验五：花器官的离体培养\*

### (一)目的：

本实验是建立在植物组织培养技术基础上的。组织培养的方法为我们了解植物生殖生理，以及确定各个生殖部分的相互关系，进行严密的研究做出了深远的贡献，也就是在已知的化学组成培养基上、在控制的条件下培养整个花序、花、子房或胚珠，甚至在试管里进行受精和胚胎发生，建立支柱再生体系，从而了解整个胚胎发生过程。

随着植物组织培养技术的发展与完善，许多学者为进一步探索植物开花奥秘，利用环境条件易控的组织培养技术对离体植物组织或器官进行了开花调控研究。应用离体培养方法研究开花的直接效益不仅有利于控制组织分化的方向，而且能为花的发端与花器官的形成提供有益启示。通过对植物离体条件下的花芽发育研究，不仅丰富了植物花发育生物学内容，而且更加深了人们对植物花发育奥秘的理解与认识。

### (二)材料：

草莓（或其它材料，如大豆、玉米、油菜等）

### (三)实验步骤：

1. 查资料，制定实验方案
2. 培养基的制备
3. 外殖体的选取
4. 外殖体的培养
5. 植株再生

### (四)实验方法（以草莓为例）

1. 取处于单核期的花蕾，（用镜检的方法确定单核期），用无水乙醇快速浸泡浸泡 2 秒~3 秒，再用 0.1% 的升汞浸泡 15 分钟，最后用无菌水中洗数次，在无菌条件下，用

\* 1. 实验五和实验六由于实验周期较长，因而可根据开课学期的季节特点灵活安排实验时间，不必拘泥于试验指导安排的实验顺序。

无菌针将已消毒的花蕾固定在已经过灭菌的大橡皮上。用已灭菌的解剖刀和解剖针小心剥开花蕾，取出花药（注意：不要带花丝），将取出的花药接种到装有愈伤组织诱导培养基的三角瓶中，愈伤组织诱导培养基组成为：MS+BA（2mg/L）+ NAA（0.2mg/L）。培养条件为 22℃~25℃，每天 18h3000LX 光照，大约 15—25d 即可形成愈伤组织。

2. 当愈伤组织增大到一定体积后，要及时将其移植到继代培养基上进行继代培养。继代培养基的组成为 MS+ BA（2mg/L）。培养条件同上。通过继代培养可保持原愈伤组

组织的分生能力，并扩大增殖系数。将继代培养的愈伤组织进行诱导分化即可形成草莓的组培苗。

3. 移植到继代培养基上的愈伤组织经过 20 天~40 天的培养，一方面可增大愈伤组织的体积，另一方面也可诱导发芽。因此，在作继代培养时，要注意移植的愈伤组织是否已发芽。若诱发的芽长度不超过 2cm 时，则可继续进行继代培养。

4. 当诱发的芽长到 2cm 以上时，在无菌条件下，将其移出，分切成单株，再移植到发根培养基上，发根培养基的组成为基本 MS 培养基，培养条件同上，20 天后，即可生根。

5. 当诱发的根长到 5~6cm 时，即可进行驯化培养。驯化前要先在培养条件下将三角瓶的封口膜去掉，使组培苗直接暴露在有菌的空气中 3—5d，再将三角瓶放在室温 15—25℃，自然散射光下 2—3d，此过程称作炼苗。炼苗结束后，可将组培苗从三角瓶中取出，用清水冲洗干净苗上粘附的培养基。再将组培苗移栽到由砂土构成的驯化基质中，二周后，待幼苗生长健壮时，即可移栽到苗圃中去。在驯化过程中，要注意保持驯化苗床的小气候，一般可在苗床上加盖小塑料棚，保持温度 20℃~15℃，湿度 70%~80%。

#### (五)思考题

1. 除了给出的例子，你还了解多少种植物花器官的离体培养技术？
2. 如何确定单核期？单核期的特点是什么？
3. 如何区分愈伤组织和胚状体？

## 实验六 胚状体的发生

### (一)目的意义：

在正常情况下，植物的胚胎发生是从精子和卵受精后的合子开始的。合子通过顺序的发育过程形成一个成熟的胚。在自然界中，除了受精卵外，胚囊中的其它成员，象珠心和珠被组织中的细胞也可像合子那样发育为胚状的结构，并可萌发形成小植株。此外，从营养器官也可产生胚状结构，这些细胞经过有丝分裂活动而不断形成新的胚状结构，并成簇地集合在外殖体的顶端。

从体细胞形成胚状结构的形态发生，依赖于植物的组织培养。在植物离体培养的系统中，诱导体细胞胚胎发生，形成小植株。再生植株是通过与合子胚相似的胚胎发生过程形成的。

胚状体的研究为研究植物细胞的分化、发育、全能性表达和遗传转化、突变体筛选提供了良好的基础，因而受到了研究者的重视。植物的胚胎发生除合子外，也可从体细胞和其它与生殖有关的细胞发生，扩大了对胚胎发生的研究对象。在植物组织培养中，诱导胚状体产生再生植株比其它方式有三个显著的优点，即数量多、速度快、结构完整。在非常规育种工作及其它农业、林业和园艺工作中显然有特殊的价值。

体细胞胚胎发生做为胚胎发生的一种特殊现象有着深远的意义。它本身具有繁殖快，

单细胞起源，两极性优点，使它能在以下几点有所应用。1.遗传转化（采用胚性愈伤组织进行遗传转化，可避免出现嵌合体，而得到大量植株）；2.种质保存（胚性愈伤组织可在适宜的条件保存，而其它愈伤组织不能长期保存）；3.快速繁殖植物；4.制备人工种子。

影响植物体细胞胚胎发生的主要因素包括基因型、外殖体的生理状态和发育程度、培养基、植物生长调节剂以及渗透压等。不同基因型体细胞胚胎发生频率不同；处于生理代谢旺盛而分化程度较低的组织有利于诱导体细胞胚胎的发生；培养基中的元素对体细胞胚胎发生起了至关重要的作用；诱导状体的激素，所基因型的不同而不同；渗透压也影响植物体细胞胚胎发生的效果。另外外界光照、温度条件也起着至关重要的作用。

这个实验类似于一个小的科研课题，学生在实验之前学要在查阅有关资料的基础上，写出各自的实验方案，然后根据实验方案进行实验。通过本实验，一方面使学生进一步了解胚胎发生过程，掌握胚胎发生的一般规律，明了胚状体的发生途径，为将来进行胚状体的实践应用打下良好的基础；另一方面，使学生在掌握基础知识基础上，把所学知识应用于实践，很好地激发了学生的创造性，促进了学生创新意识、创新能力培养，有助于提高学生的综合素质。

## **(二)材料：**

大豆子叶（或其它材料，如草莓、玉米、油菜等）

## **(三)实验步骤：**

1. 查资料，制定实验方案
2. 培养基的制备
3. 外殖体的选取
4. 外殖体的培养
5. 显微镜观察

## **(四)实验方法（以大豆为例）**

### **1. 外植体制备**

将大豆的种子播种于温室中，当豆荚里种子大小为 4.0~7.0mm 时，从大豆植株上摘取豆荚，用洗衣粉水洗净，放在 75%乙醇中消毒 0.5~1 分钟，再用 0.2%HgCl<sub>2</sub> 浸泡 10 分钟，然后用无菌水冲洗 4—5 次。在超净工作台上剥开豆荚取出种子，切开种皮挤出幼胚，切掉胚轴，成两瓣子叶，使子叶的近轴面朝上接种于诱导培养基上。

### **2. 培养条件**

光照培养箱。培养温度控制在 26 ± 1℃，日光灯每天照 12 小时，固体培养基 PH=5.8。

### **3. 体细胞胚的诱导**

诱导培养基为 MS 基本培养基（其中蔗糖浓度为 2%），附加高浓度的生长素（10-20ppm2,4-D 和 10ppmNAA）。将未成熟子叶在诱导培养基上培养 6—8 天后，子叶表皮上形成球形小突起，这些小突起大约 10 天后形成球形胚。以后这些球形胚进一步发育成心形胚、鱼雷形胚、子叶形胚。有些体细胞胚发育成喇叭形胚、叶形胚等畸型胚。

在诱导培养基上产生的体细胞胚中只有个别的能直接发育成熟，大部分体细胞胚需要转到成熟培养基上才能发育成熟。成熟培养基参考周思君（1989）等的方法，采用 MS+1g/L 脯氨酸+10%蔗糖+0.5%活性炭，则大部分体细胞胚发育成熟。

### **4. 胚状体的观察**

利用体视显微镜观察各个时期的体细胞胚的结构与发育特点。

**(五)思考题:**

1. 体细胞胚状体与合子胚的结构是否相同?
2. 进行体细胞胚的诱导时, 作为外殖体的材料是否有方向性?
3. 体细胞诱导出的胚状体是否可以直接发育成正常的成熟胚?

**主要参考文献**

1. 胡适宜, 花粉生活力测定, 植物学通报, 1993. 10(2): 60
2. 胡适宜, 花粉发育时期的检查和花粉壁性质的鉴定, 植物学通报, 1993. 10(3): 51.
3. 胡适宜, 花药绒毡层膜的分离及绒毡层膜用于光镜和电镜观察的样品制作方法, 植物学通报, 1993. 10(4): 54.
4. 胡适宜, 孚尔根整体染色法在植物胚胎学中的应用, 植物学通报, 1994. 11(1): 57.

5. 胡适宜, 检查花粉在柱头上萌发和花粉管在花柱中生长的制片法, 植物学通报, 1994. 11(2): 58~60.
6. 胡适宜, 胚和胚乳的解剖和整体制片法, 植物学通报, 1994. 11(3): 55~57.
7. 胡适宜, 同时显示胚中贮藏的淀粉、蛋白质和脂类的永久制片法, 植物学通报, 1994. 11(4): 49~51.
8. 杨弘远, 植物胚胎学中的整体透明技术, 植物学通报, 1988. 5(2): 114.
9. 吴燕等, 一种花粉原生质体电镜制样技术, 植物学通报, 1991. 8(3): 62.
10. 周嫦等, 被子植物胚囊酶法分离的研究, 固定材料的分离技术与显微观察, 植物学报, 1982. 24(5): 403.
11. 杨弘远等, 用酶解技术观察泡桐与芝麻的大孢子发生和雌配子体发育过程, 植物学报, 1984. 26(4): 355.
12. 周嫦等, 金鱼草胚囊的人工分离, 实验生物学报, 1984. 17(2): 141.
13. 陈宝理等, 绒毡层及小孢子发育研究的扫描电镜样品制备, 植物学通报, 1989. 6(2): 124.
14. 李师翁等, 用苯胺兰压片法观察小孢子和雄配子体发育过程中胼胝质的动态, 植物学通报, 1990. 7(1): 60.
15. 朱至清, 一种高效的小麦花药培养新方法, 植物学通报, 1991, 增刊: 24.
16. 郭光沁, 小麦雌配子体发育过程中酸性磷酸酶活性定位, 西北植物学报, 1992. 12(1): 27.
17. 田国伟等, 小麦受精过程中酸性磷酸酶的超微细胞化学定位, 植物学报, 1994, 36(4): 251.
18. 田国伟等, 小麦胚珠在受精过程中 ATP 酶的超微细胞化学定位, 植物胚胎学中的整体透明技术, 植物学报, 1993. 35(5): 329.
19. 杜中等, 观察植物胚胎发育的简便方法, 植物杂志, 1996. 第四期. 40.
20. 兰大细胞学及遗传学教研室, 细胞生物学实验, 高等教育出版社 1986.
21. 朱澈主编, 植物染色体及染色体技术, 科学出版社 1982.
22. 中国植物学会编印, 植物组织培养法.
23. 徐是雄编著, 植物材料的薄切片超薄切片技术, 北京大学出版社, 1981.
24. B. E 朱尼珀等著, 植物电子显微镜技术, 科学出版社, 1977.
25. 翟中和编, 细胞生物学基础, 北京大学出版社, 1987.
26. 桂明珠编, 植物胚胎学实验及其研究法, 东北农学院, 1990.
27. 王耀芝编, 被子植物胚胎学实验指导, 兰州大学生物系.
28. 植物胚胎学实验, 南京农业大学植物教研室, 1985.
29. 付文吾, 被子植物胚胎学实验指导, 华中农业大学植物教研室.

## 附：几种常用培养基配方

单位：毫克/升 (mg/L)

		MS	B <sub>5</sub>	White
大	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650		

量 元 素	KNO <sub>3</sub>	1900	3000	80
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170		
	MgSO <sub>4</sub>	370	500	750
	CaCl <sub>2</sub>	440	150	
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>			300
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			200
	Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		150	19
	KCl			65
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		134	
铁 盐	FeSO <sub>4</sub>	27.85	27.85	
	Na <sub>2</sub> -EDTA	37.25	37.25	
微 量 元 素	KI	0.83	0.75	0.75
	NaMoO <sub>4</sub>	0.25	0.25	
	MoO <sub>3</sub>			0.001
	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>			2.5
	CuSO <sub>4</sub>	0.025	0.025	0.01
	CoCl <sub>2</sub>	0.025	0.025	
	MnSO <sub>4</sub>	22.3	10	5
	ZnSO <sub>4</sub>	8.6	2	3
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	3	1.5
有 机 物	肌醇	100	100	
	烟酸	0.5	1	0.05
	VB <sub>6</sub>	0.5	1	0.01
	VB <sub>1</sub>	0.1	10	0.01
	甘氨酸	2		3
其 它	蔗糖	30000	20000	20000
	琼脂	7000	7000	7000