

Занятие 1.

Тема: Основы ботанической микротехники. Микроскоп и правила работы с ним. Методика приготовления микропрепаратов.

Цель занятия: Ознакомиться с устройством микроскопа и основными приемами работы с ним. Научиться готовить временные микропрепараты. Научиться различать на микропрепаратах отдельные части клетки.

Вопросы исходного уровня.

1. Устройство микроскопа и правила работы с ним.
2. Что такое фокусное расстояние?
3. Как правильно приготовить временный микропрепарат?
4. Какие структуры растительной клетки видны в световой микроскоп?
5. Отличия растительной и животной клетки.

Материал: сочные чешуи луковицы, листья традесканции.

Реактивы: раствор йода в йодистом калии.

Оборудование: микроскопы, лупы, предметные и покровные стекла, препаровальные иглы, пинцеты, скальпели, лезвия, вата, марля.

Работа с микроскопом

Микроскоп установить перед собой (рис.1). С помощью макрометрического винта (вращением на себя) приподнять на 1- 1,5 см тубусодержатель. Поворачивая револьвер, поставить объектив 8х в рабочее положение. Открыть полностью диафрагму. Поднять конденсор до уровня предметного столика.

В микроскоп смотрят левым глазом, не закрывая при этом правый. Качество изображения в микроскопе в значительной степени зависит от освещения. Для этого используют зеркало микроскопа. Поворачивая зеркало, поставить его под таким углом к источнику света, чтобы отраженные лучи прошли через отверстие в предметном столике и системы линз микроскопа. Правильная установка зеркала дает ровное яркое освещение поля зрения микроскопа. Работу с микроскопом всегда начинают с малого увеличения. Положить микропрепарат на предметный столик так, чтобы объект находился как раз под объективом. Для фиксации микропрепарата предметное стекло прижать клеммой. Опустить с помощью макровинта тубусодержатель так, чтобы объектив почти касался препарата, затем, медленно вращая макровинт на себя, поднимать тубусодержатель,

глядя в окуляр, пока не появится изображение. Оно должно появиться, когда объектив будет отстоять от препарата примерно на 1- 1,5 см.

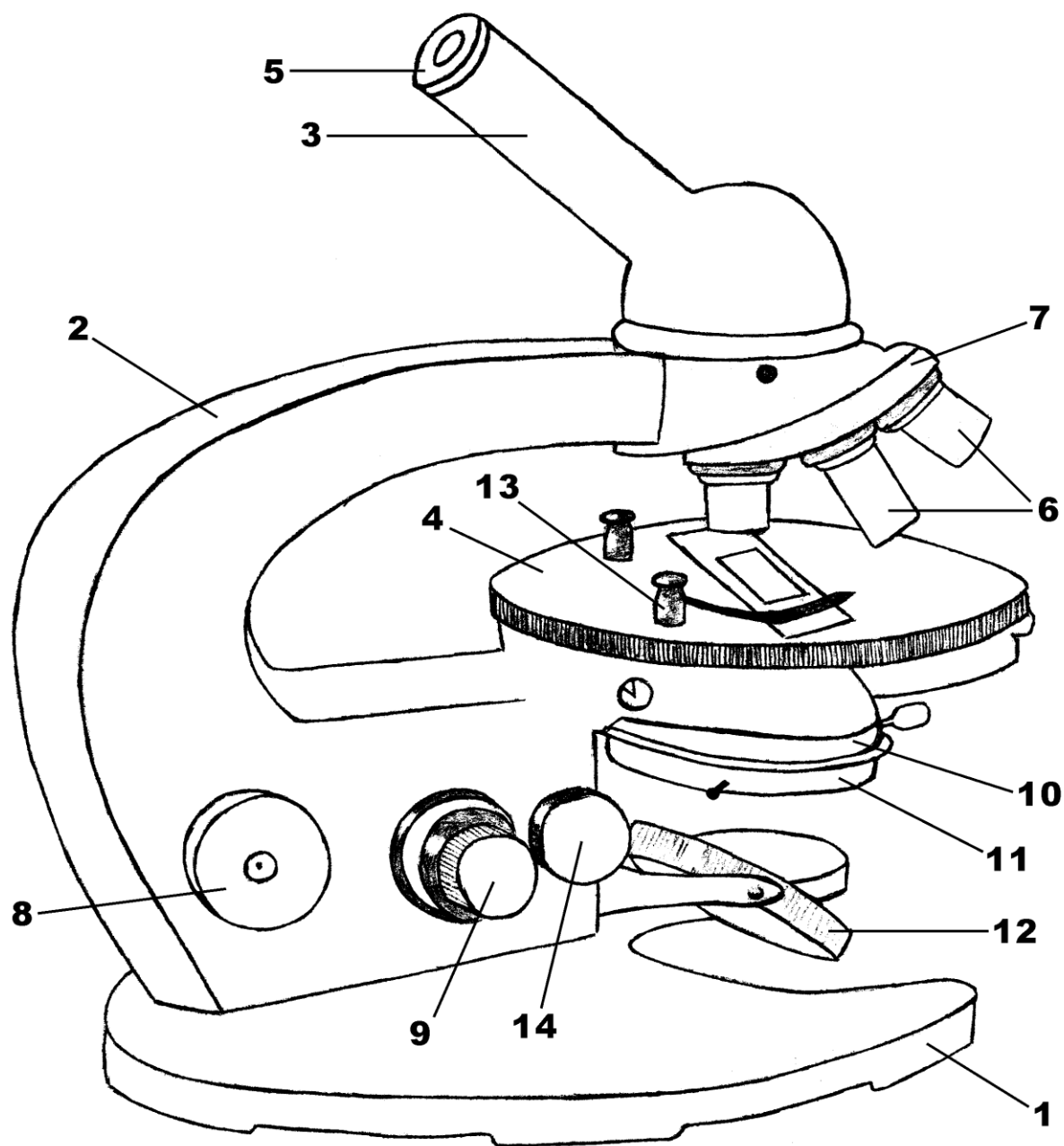


Рис. 1. Микроскоп МБР – I.

1 – основание (штатив), 2 – тубусодержатель, 3 – тубус, 4 – предметный столик, 5 – окуляр, 6 – объективы, 7 – револьвер, 8 – макрометрический винт, 9 – микрометрический винт, 10 – диафрагма, 11 – конденсор, 12 – зеркало, 13 – клемма (зажим для микропрепарата), 14 – винт регулировки конденсора.

С помощью макровинта установить фокусное расстояние для получения наиболее четкого изображения в микроскопе.

Перед переводом микроскопа на большое увеличение выбрать нужное место среза, поставив его в центр поля зрения и только после этого перевести на большое увеличение, осторожно вращая револьвер до щелчка. Изображение на большом увеличении микроскопа получается на расстоянии объектива от препарата на 1- 2 мм. Более четкое изображение на большом увеличении можно получить, вращая микрометрический винт (вращать не более 1/2 оборота в ту и в другую сторону).

Изучая микропрепарат при большом увеличении, левую руку все время следует держать на рукоятке макровинта, чтобы сфокусировать необходимую часть поля зрения.

После окончания работы нужно перевести микроскоп на малое увеличение и убрать микропрепарат. Снимать микропрепарат из-под объектива 40x строго запрещается, так как можно повредить фронтальную линзу объектива. После работы микроскоп следует закрыть чехлом для защиты от пыли.

Методика изготовления срезов и временных микропрепаратов

Объект, подлежащий микроскопическому исследованию, должен быть очень тонкий и прозрачен. При изучении анатомического строения органов чаще всего делают тонкие срезы бритвой. Бритва должна быть очень острой. Срезы органов делают в зависимости от цели исследования в разных направлениях. С осевых органов чаще всего делают поперечные срезы, бритва должна быть направлена строго перпендикулярно к продольной оси органа. Иногда необходимо сделать тангентальный срез (параллельно поверхности органа) или радиальный срез по радиусу осевого органа.

Объект необходимо взять в левую руку так, чтобы он возвышался над уровнем пальцев на 3-4 мм. Правой рукой держат безопасную бритву, зажимая ее большим пальцем сверху, а указательным и средним снизу в этом же месте, оставляя свободным лезвие, обращенное влево. Перед изготовлением среза поверхность объекта, с которой предполагается делать срез, должна быть выровнена. Бритву смачивают в воде и делают срез одним скользящим движением бритвы вкось слева направо по направлению к себе. Не обязательно делать срез через весь орган, а достаточно срезать узкую полоску, проходящую через наружные и внутренние ткани органа. При этом наиболее тонкие и ровные срезы получаются, если срез начинают не от края объекта, а от его середины.

Рекомендуется сразу делать несколько срезов и сбрасывать их в чашку Петри с водой. Тонкие и ровные срезы будут плавать горизонтально, а неудачные — под углом. Самые тонкие ровные срезы переносят (лучше акварельной кисточкой) на предметное стекло и, в случае необходимости, обрабатывают реактивами.

Реактивы, содержащие кислоту, во избежание порчи микроскопа после прокрашивания среза снимают ленточкой фильтровальной бумаги, и перемещают препарат в каплю воды.

На середину предметного стекла пипеткой наносят 2-3 капли воды, и при помощи препаровальной иглы переносят в нее наиболее тонкие срезы. После этого их закрывают покровным стеклом. Опускать его следует осторожно, расположив предварительно под углом 45° к предметному стеклу, и прикоснувшись нижним краем к воде. Если под покровное стекло на объект попали пузырьки воздуха, то не следует нажимать на стекло сверху, а необходимо приподнять покровное стекло и вновь опустить его, добиваясь, чтобы не было пузырьков воздуха на объекте. После этого надо удалить избыток воды кусочком фильтровальной бумаги. Если под покровным стеклом не все пространство занято водой, то ее необходимо осторожно добавить пипеткой, не снимая покровного стекла. Приготовленный микропрепарат помещают на предметный столик и приступают к его изучению. В процессе работы необходимо следить, чтобы срезы постоянно находились в жидкой среде, иначе ткани исследуемого объекта высыхают и деформируются.

Для работы с препаратом в течение нескольких дней вместо воды под покровное стекло наносят глицерин (он не высыхает).

Качественные реакции, применяющиеся для определения тканей и клеточных структур при изучении анатомии растений:

1. Для определения содержания крахмала используют слабый раствор йода в йодистом калии, он образует комплексное соединение с крахмалом сине-фиолетового цвета
2. Реактивом на жиры и жироподобные вещества является жирорастворимый краситель судан-III, который поглощается жирами и окрашивает их в оранжевый цвет.
3. Характерными реакциями на белок являются:
 - 1) биуретовая реакция — под воздействием водного раствора медного купороса и едкой щелочи белки окрашиваются в фиолетовый цвет,
 - 2) ксантопротеиновая реакция — под воздействием крепкой азотной кислоты белок желтеет, желтизна усиливается до оранжевого цвета.
4. Реактивом на клетчатку является хлор-цинк-йод. Хлор-цинк окрамаливает клетчатку, йод окрашивает крахмал в сине-фиолетовый цвет.

5. Для обнаружения лигнина используются:
- 1) флороглюцин и концентрированная серная (соляная) кислота. Пропитанные лигнином клеточные стенки окрашиваются реактивом в малиново-красный цвет.
 - 2) 1% раствор марганцово-кислого калия с аммиаком и 10% раствором соляной кислоты (реакция Меуле). На срез наносят 1% раствор марганцово-кислого калия. После пятиминутной выдержки и удаления краски наносят каплю соляной кислоты (10%), и после обесцвечивания среза — каплю аммиака (лигнин окрашивается в красный цвет).

Методика выполнения работы.

Задание 1. Устройство микроскопа и основные приемы работы с ним.

Рассмотреть основные системы микроскопа: механическую, оптическую и осветительную. Записать в альбом названия их частей и правила работы с микроскопом.

Задание 2. Клетки кожицы лука (*Allium cepa* L.).

Приготовить временный микропрепарат кожицы лука. Для этого отделить от луковицы мясистую чешуйку. На внутренней ее стороне находится тонкая пленка. Снять ее пинцетом и отрезать кусочек размером в 3-4 кв. мм. Положить этот кусочек на предметное стекло, капнуть пипеткой каплю раствора йода на пленку и накрыть покровным стеклом.

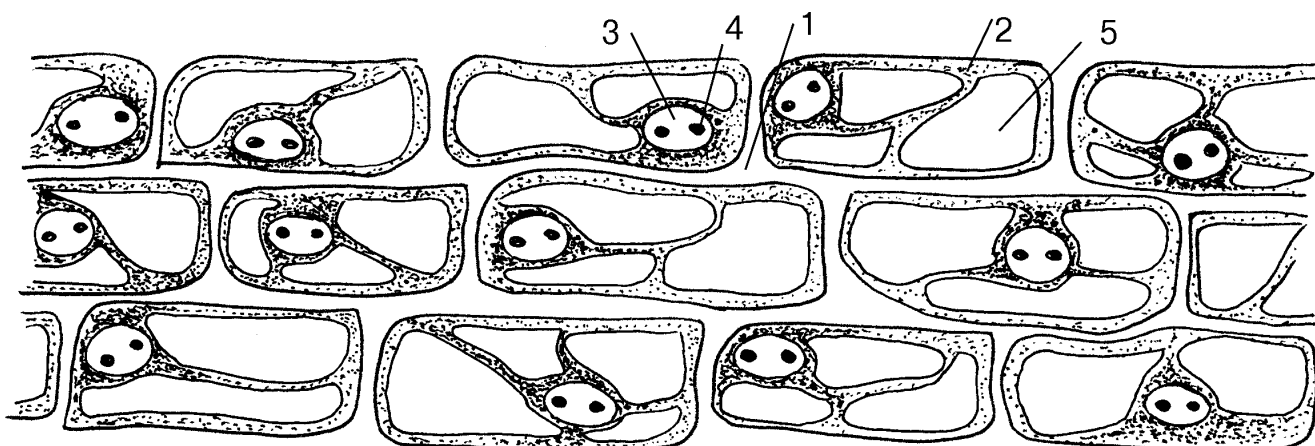


Рис. 2. Строение клеток кожицы лука

1 - клеточная стенка, 2 - цитоплазма, 3 - ядро, 4 - ядрышко, 5 - вакуоль

Рассмотреть препарат при малом увеличении микроскопа. На препарате видна группа вытянутых клеток. Крупные округлые ядра в клетках окрашены в желто-коричневый цвет. Перевести микроскоп на большое увеличение, и найти стенку клетки. При внимательном

рассмотрении видна зернистая структура цитоплазмы. Неокрашенные пустоты в цитоплазме представляют собой вакуоли (рис. 2).

Зарисовать несколько клеток, пользуясь рис. 9, и сделать обозначения кресточной стенки, цитоплазмы, ядра с ядрышком, вакуоли с клеточным соком.

Задание 3. Пластиды в клетках эпидермы листа традесканции (*Tradescantia sp.*).

Приготовить временный препарат нижней эпидермы листа одного из видов традесканции. Для этого препаровальной иглой надорвать и поддеть эпидерму с нижней стороны листа, затем оторвать небольшой кусочек этой прозрачной пленки — «кожицы». Снятый кусочек эпидермы перенести иглой в каплю воды на предметное стекло и накрыть объект покровным стеклом.

При малом увеличении микроскопа найти участок эпидермы с прозрачными клетками и рассмотреть их при большом увеличении. Найти ядро, границу между цитоплазмой и вакуолями, а также в пределах цитоплазмы (особенно вблизи ядра) мелкие бесцветные шаровидные тельца. Определить к какому типу пластид эти тельца относятся (рис. 3).

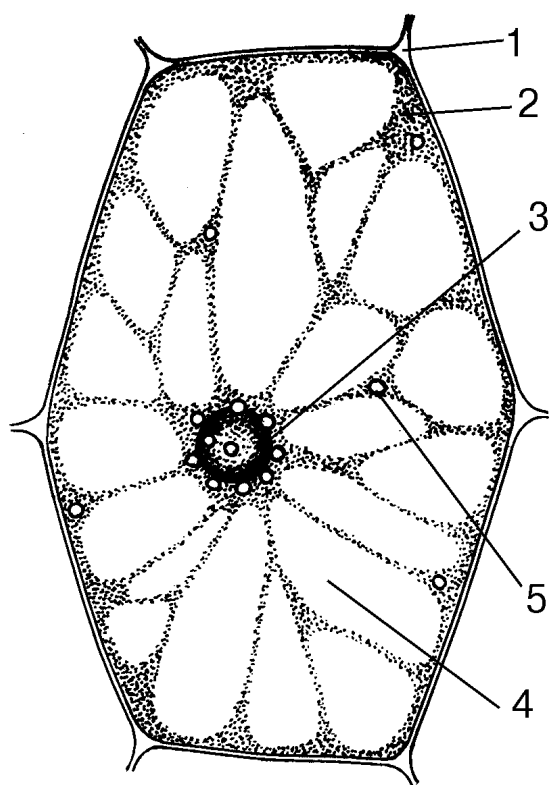


Рис. 2. Лейкопласты в клетках листа традесканции

1 – клеточная стенка, 2 – цитоплазма, 3 – ядро, 4 – вакуоль, 5 – лейкопласты.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие реактивы используются для приготовления микропрепаратов?
2. Какие части входят в оптическую систему микроскопа?
3. Как правильно поменять микропрепарат на предметном столике микроскопа?
4. Почему объект, рассматриваемый в световой микроскоп, должен быть тонким и прозрачным?
5. Какими растительные клетки бывают по форме?
6. Чем обусловлена окраска листьев и плодов растения?