

大,据 1987 年凤凰山农场用国产东风与东德 E512 脱谷机作收获比较在油菜生长一致的同—地段各拾禾一圈,折合亩产,国产东风

比东德 E512 少收 15 公斤,按测产亩产 113 公斤,东德 E 512 损失 13%,国产东风损失 32.9%,国产东风比东德 E512 多损失 20%。

植物细胞的半薄切片技术及其应用

李学湛 宋英淑 于智深 朱光新 郑成国

(黑龙江省农业科学院)

摘 要

本试验将半薄切片技术应用于植物细胞学研究中,并对其方法进行了如下几方面的改进:①减少了制片程序;②切片厚度达到了 0.1 微米,并未出现皱褶;③增加了染液的溶质浓度,达到稳定的多色性染色效果;④根据不同植物组织,优选出最佳切片、染色厚度。

前 言

半薄切片介于 5 微米石蜡切片与 600 埃超薄切片之间,在高倍光镜下可显示电子显微镜的低倍图像。目前,国外这项技术已应用于植物细胞学研究^[6、7、8、9、10],国内医学研究中也已得到应用^[1、2、3、4、5]。但切片厚度均在 0.5 微米以上,在植物细胞学研究方面应用甚少。最近,我们在大豆抗涝性生理研究中运用了半薄切片技术,并对经典半薄切片技术进行了改进,减少了制片程序,增强了染色效果,根据不同植物组织优选出最佳切片和染色厚度,并使切片厚度达到了 0.1 微米。现将其结果报导如下。

材料与方法

一、供试材料

半薄切片:取样主要结合大豆抗涝性生

理研究进行。取用经渍水处理的大豆生育期叶片、茎、种子萌动期子叶、芽期根尖;取用小麦受精 6 小时的子房、胚珠、柱头和花粉粒。

石蜡切片:取用经渍水处理的大豆叶片、根尖;取用洋葱根尖和小麦愈伤组织。

二、制片程序

(一) 半薄切片样品制备

样品切片前处理在徐是雄^[4]方法的基础上稍做修改。

1. 将新鲜样品分取 1—4 平方毫米小块;
2. 用 1—4% 戊二醛(室温)固定 1—4 小时(不同组织固定时间有异);
3. 用 0.1 M 磷酸缓冲液清洗两次,每次停留 15 分钟;
4. 再用 1% 锇酸固定 1—2 小时(如不需上电镜观察样品,可用 FAA 固定液固定 1—2 小时,省去戊二醛和锇酸的双重固定);
5. 再用 0.1M 磷酸缓冲液清洗两次,每次停留 15 分钟;
6. 在室温下,用不同级数乙醇脱水,每次停留 15 分钟;
7. 用 1:1 丙酮和环氧树脂混合液渗透 4 小时,然后再换一次新鲜的包埋剂过夜;
8. 用新配制的包埋剂包埋样品^[8],在

注:本课题为黑龙江省农科院青年科学基金项目。

70℃下聚合8小时;

9. 修整包埋块, 在超薄切片机或在改装的光学切片机上, 用玻璃刀制片;

10. 切片后, 用白金耳将切片捞至干净载玻片水滴中, 置于80℃烘箱中烘烤10分钟;

11. 将载有切片的玻片, 置于80℃天青Ⅱ—亚甲基兰(pH6.4)染液中染1—2分钟, 部分切片经“软化剂”处理30分钟。如用苏丹Ⅲ染色, 需在60℃下染色10分钟(切片染色及染液配方是在李相忠方法基础上稍加修改);

12. 用清水洗净后, 再把载有切片的玻片放入碱性复红染液中1分钟(染料配方见后);

13. 水洗后, 可直接上光镜观察, 待干燥后用加拿大树胶封片, 备用。

(二) 石蜡切片的制片程序

按常规石蜡切片法, 固定、脱水、脱蜡和封片。

(三) 染液配方

1. 天青Ⅱ—亚甲基兰染液: 天青0.3克、甘油10毫升+亚甲基兰0.26克、甲醇10毫升、磷酸缓冲液(pH6.4)30毫升、蒸馏水50毫升。

2. 碱性复红染液: 碱性复红0.1克、50%乙醇100毫升, 将其混合后取6毫升, 加蒸馏水稀释至60毫升。

3. 苏丹Ⅲ染液: 制成饱和的70%乙醇—苏丹Ⅲ溶液。

4. 亚甲基兰—碱性品红染液: 磷酸氢二钠0.5克, 碱性品红0.2克、亚甲基兰0.2克、硼酸溶液(0.5%)15毫升、氢氧化钠(0.72%)10毫升(pH8.4), 蒸馏水70毫升。

结 果

石蜡切片的光镜效果: 图1—2为洋葱根尖, 小麦愈伤组织, 切片厚度为6微米, 可见细胞重叠, 偶见细胞核仁, 但细胞器不清, 染色效果不佳。

半薄切片的光镜效果: 不同大豆品种对渍水的敏感性不尽相同。取不同耐渍水性大豆种子渍水4天后的子叶, 切片厚度为1微米。天青Ⅱ—亚甲基兰和碱性复红重染后, 细胞壁呈红色, 脂体呈黄色, 蛋白体呈紫红色。光镜下清晰可见不同耐渍水性大豆子叶细胞结构的不同图像。如感性太豆(合丰25)种子的子叶细胞, 其壁完整, 但质壁分离; 而耐性大豆种子的子叶细胞, 不仅其壁完整、充实, 而且未见质壁分离现象, 蛋白体分布广泛, 并开始分化、分解, 液泡逐渐形成。收到了理想的染色效果。

同时, 小麦花粉粒、子房、胚珠经天青Ⅱ—亚甲基兰和碱性品红复染后, 染色均匀、反差大, 胚珠的核仁呈深兰色, 淀粉粒为红色, 花粉粒的萌发孔及内含物均充分显示出来, 并且细胞分裂前期、中期及末期染色体的不同分裂相及其分布均十分清晰可见。

渍水条件下的大豆叶片, 茎和根切片经天青Ⅱ—亚甲基兰碱性品红重染后, 微体及茎的导管、细胞核仁、根的中柱及四原型、木质部、韧皮部均清晰可见, 呈现出多色性染色效果。

讨 论

半薄切片的制片程序、步骤要求十分严格。因为, 切片的反差清晰度, 很大程度上取决于染色的质量, 所以切片的染色技术是做好半薄切片的关键环节。国内报导的半薄切片厚度在0.5—2微米之间, 当厚度小于0.5微米时, 切片组织不易着色或出现染色不均, 而厚度达到0.1微米, 染色后出现大量皱褶, 直接影响观察效果, 成为半薄切片技术的一个难以解决的问题。为了克服这些难点, 本试验改进了半薄切片技术的常规方法^[1]: 染色前不经“软化剂”处理, 而把载有切片的玻片置于80℃温箱中烘烤10分钟后, 立即将切片置于同等温度的光学染液中

染色,并将染液溶质浓度增加一倍,取得了相当稳定的多色性染色效果,好于经“软化剂”处理的对照切片。其原理可能是切片和染液加热到80℃时,染液分子的运动速度加快,加之溶质的颗粒数增加,与组织成份有效碰撞机遇增多,而且由于切片菲薄(0.1—1.5微米),染液浸透切片阻力小,时间短、反应速度加快等缘故。

另外,优选好光学染料,并适当调节光学染液的酸碱度对切片的多色性染色效果也起着关键性的作用。我们在制备半薄切片的过程中,试用了10余种光学染料,并逐一进行了筛选,首次将碱性复红应用于植物组织切片,细胞壁经碱性复红染料染色,只需1分钟即着色,而且色泽鲜艳,好于经典的番红、固绿双重染色效果。还优选出适用于多种植物组织切片的双重染液配5对,天青Ⅱ—亚甲基兰、碱性复红,收到了理想的染色效果。通常制备半薄切片的染液天青Ⅱ—亚甲基兰的pH 6.9,当切片厚度低于0.5微米时,细胞成份不易着色,如果把pH 6.9调至pH 6.4染色效果很好,色调均匀,反差良好,这可能是切片组织中细胞器嗜酸性强的原因。这些改进的方法,国内尚无报导,主要优点是切片薄,染色时不出现皱褶,染色均匀、分辨率高,细胞器结构清晰易见。

实验中还发现,若想得到植物特定组织细胞的标准切片,就应掌握这一组织切片、染色的最佳厚度。经反复多次试验认为,某一组织细胞的理想切片厚度,也是这一组织细胞染色效果最佳厚度。大豆叶片、茎和根切片最佳厚度分别为0.1、0.3和0.5微米、

小麦子房和胚珠以0.1—0.3微米,小麦花粉粒以0.2微米厚度为宜。以上切片厚度,不仅能清晰地反映出某一组织细胞的内含成份,而且染色效果也好,是拍制教学和科研图象的优选标本。如果把改进技术后的半薄切片用做与石蜡切片和超薄切片对比观察,不仅能彼此互补不足,使同一植物组织细胞或其微细成份在三级切片上统一起来,会使植物镜检工作更加标准化、精确化。

参考文献

- [1] 李相忠,细胞超微结构及其研究方法,哈尔滨医科大学出版
- [2] 李相忠,光学高分辨性半薄切片的制备及应用价值,1980年,中华医学杂志,60卷,第4期
- [3] 孙敬三等,植物细胞学研究方法,1987年,科学出版社
- [4] 徐是雄,植物细胞的薄片超薄切片技术,1981,北京大学出版社
- [5] 朱丽霞,生物学中的电子显微镜技术,1983,北京大学出版社
- [6] Aefort, M, and I, I, Geschwind, 1953, A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei proe Nat, Acad, Sci, 39, 991—999
- [7] Feder, N, and T, P, Obrine, 1968, plant microtechnique some principles and new methods Amer J Bot, 53, 123
- [8] Alsop D. W, 1974, stain technol, 49, 265—272
- [9] Warmke, H, E, and S, L, lee, 1976 Stain Technol, 51, 179—185
- [10] Bhandar, N. N. and A sacheva, 1983, some aspects of organization and histochemistry of the embryo sac of scilla sibirica s-ato protoplasm 116, 170

征 订 启 事

我部现有1988年《黑龙江农业科学》精装合订本及1989年1—6期单行本,合订本每本7.50元,单行本每期0.75元,欢迎广大读者踊跃订阅。

另外,我部尚有少许1987年《黑龙江农业科学》精装合订本,每本4.50元,由于数量有限,欲购者请来、来函订阅。

《黑龙江农业科学》编辑部