

大豆茎顶端分生组织石蜡切片的制备

李晓梅

(枣庄学院生命科学系, 山东 枣庄 277160)

摘要:为探讨大豆茎顶端分生组织石蜡切片的制作方法, 观察大豆茎顶端发育过程的微观结构变化。将大豆顶芽经固定、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、染色等一系列过程, 获得其纵切片。结果表明: 生长锥顶端、叶原基、花原基等分裂活跃的部位染色较深, 髓分生组织部位染色较浅; 在营养生长阶段, 叶原基依次从茎顶端分生组织底部发育, 逐渐变大; 在生殖生长阶段, 顶端变成伸长的圆顶形, 然后开始分化各轮花器官。研究结果可为深入观察大豆茎顶端分生组织解剖结构及分生组织发育的分子生物学研究提供基础。

关键词:大豆; 顶端分生组织; 石蜡切片

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2008)04-0708-03

Manufaction of Paraffin Section on Apical Meristem of Soybean

LI Xiao-mei

(Department of Biology Science, Zaozhuang University, Zaozhuang 277160, Shandong, China)

Abstract: In order to obtain more microstructure information on development of soybean, the methods for apical meristem sections were studied in the paper. Based on the process of fixation, dehydration, transparency, saturated paraffin, embedding, section and dye, straight-sections of the shoot apical meristem of soybean were obtained. The results from this study indicated that the regions splitting actively, such as the top of apical meristem, leaf primordia and flower primordia, were dyed deeply. At the same time, pith meristem zone was dyed lightly. At vegetative growth stage, leaf primordia were found at the basal part of apical meristem, and they became bigger gradually. At reproductive growth stage, the dome-liked apical meristem became longer slightly, then each of floral primordia began to appear in turn. The results could provide the base for further investigation on anatomical structure and developmental biology of shoot apical meristem in soybean.

Key words: Soybean; Apical meristem; Paraffin section

茎顶端分生组织可分化为茎、叶、花、果实, 它对植物的形态发生极为重要。大多数植物在这方面都有一些研究。大豆茎顶端分生组织形态发生的研究在国内外也已有一些报道。早期是凭借放大镜或解剖镜对大豆顶端形态发生进行观察^[1-3]。现在可通过电镜技术对其形态进行研究^[4], 但在制作过程中, 物理、化学方法的处理易使幼嫩复杂的结构受到损伤甚至变形, 且费用较高, 并且在研究大量材料时并不实用。但石蜡切片可完成大量材料的连续观察, 同时, 石蜡切片结合原位技术可以研究特定基因序列在组织和细胞中的时空分布规律^[5]。为此, 大豆茎顶端分生组织连续切片的制备就显得尤为重要。但大豆茎顶端分生组织的石蜡切片在制作过程中常常出现划痕、破碎、染色不良等情况, 国内大豆

茎顶端分生组织的石蜡切片技术尚无系统报道, 文章旨在用石蜡切片技术找寻可获得清晰、完整的大豆茎顶端分生组织的制片方法, 为深入研究大豆茎顶端分生组织解剖结构及分生组织发育的分子生物学奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 自贡冬豆 (*Glycine max* (L.) mer), 有限结荚习性, 产于四川自贡。

1.1.2 试剂及配制 切片石蜡: 上海三精工贸有限公司; 桔红 G、苏木精: 上海化学试剂厂 (Fluka 分装); 加拿大树胶: 德国 Serva 公司; 其它均为国产分析试剂。

收稿日期: 2007-12-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070456)。

作者简介: 李晓梅 (1972-), 女, 硕士, 主要从事作物生理研究工作。E-mail: elixiaomei@163.com。

海氏铁矾苏木精染液:常规法配制^[6]。

桔红 G 丁香油饱和液:0.5 g 桔红 G 溶于 25 mL 100% 酒精后,再加入 50 mL 丁香油中,然后将其放入 30~40℃ 烘箱中,待酒精挥发后即可使用。

加拿大树胶封固液:先将加拿大树胶在 40℃ 温箱中干燥 1 d 以上,然后用二甲苯以 1:1 稀释加拿大树胶。

1.2 方法

1.2.1 取材、固定 用镊子和解剖针小心剥出生长点,放入 FAA 固定液。为使固定液充分进入组织,用真空抽气机抽气 10 min 左右,使材料沉底。可长期保存。

1.2.2 脱水、透明 按 50% 乙醇→70% 乙醇→80% 乙醇→95% 乙醇→100% 乙醇→100% 乙醇→1/2 二甲苯+1/2 乙醇→二甲苯 I→二甲苯 II 顺序脱水、透明,每级 2 h。在 1/2 二甲苯+1/2 乙醇混合液中加少许番红粉末,以便在以后切片中材料与石蜡容易辨别。

1.2.3 浸蜡、包埋 按 2/3 二甲苯+1/3 石蜡→1/3 二甲苯+2/3 石蜡→石蜡 I→石蜡 II 顺序浸蜡。2/3 二甲苯+1/3 石蜡中可放置 4~8 h 或过夜,1/3 二甲苯+2/3 石蜡中放置 3 h,再转入融化的纯石蜡中 2 次,每次放置 2 h。然后用纸盒(用光滑的硬纸折成)常规包埋。

1.2.4 切片、贴片、烤片 修整蜡块、调整好切片机后进行切片,切片厚度 8 μm。把切好的蜡带用毛笔轻放在干净的纸上,光面朝下。镜检后选取合适的蜡片放入 37~50℃ 的温水中,让其展开。将一滴明胶滴到载玻片上,用洗干净的手抹开,再滴一滴 3% 福尔马林,用镊子将展开的切片小心的放在载玻片

上,然后放入 40℃ 温箱中干燥 24 h 以上。并且干燥的时间越长越好。

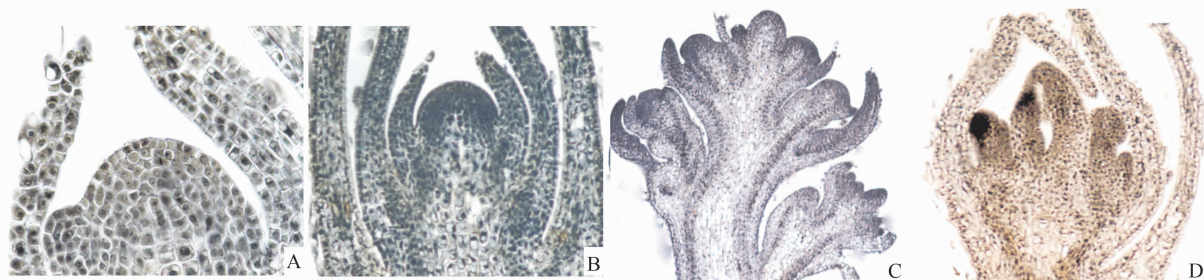
1.2.5 染色、分色、复染与封片 切片先经二甲苯 I→二甲苯 II→1/2 二甲苯+1/2 乙醇→100% 乙醇→100% 乙醇→95% 乙醇→80% 乙醇→70% 乙醇→50% 乙醇→蒸馏水顺序逐级脱蜡、复水,每级 2~5 min。然后再进行染色。采用铁矾—苏木精—桔红 G 三重染色法进行染色。4% 铁矾染色 1 h 后,水洗 30 min,过一次蒸馏水。然后用 0.5% 苏木精水溶液染色 1 h,也可加两滴 0.5% 苏木精于放有蒸馏水的染色缸中,染色过夜。第 2 天,水洗 5 min 后,用 2% 铁矾分色,之后再用流水洗 30 min。然后还要如前所述从 50%~100% 酒精逐级脱水,脱水后用 1/2 二甲苯+1/2 乙醇(加桔红 G 丁香油染液)染 15 min,最后经 2 次二甲苯透明 5 min。完成以上过程后就可用加拿大树胶封固制成永久装片。

2 结果与分析

通过上述方法获得的石蜡切片组织完整,染色清晰,细胞核被染为蓝黑色,细胞质为桔红色。生长锥顶端、叶原基、花原基、原形成层等分裂活跃的部位染色较深。髓分生组织部位染色较浅,液泡化程度高。

2.1 营养生长阶段

叶原基依次从茎顶端分生组织底部发育,逐渐变大。最初,在顶端基部出现凸起(叶原基形成初期),凸起与分生组织表面成钝角(图 1A),随着内部细胞的分裂,凸起逐渐变大、变长,与分生组织表面角度逐渐变小,后成锐角(图 1B)。最后叶原基发育成小叶。



A, B 为营养生长期的大豆茎顶端分生组织; C 为生殖生长期的大豆茎顶端分生组织(×50); D 为雌蕊原始体和雄蕊原始体进一步分化(×50)。

A and B are apical meristem of soybean at vegetative growth stage 1 (×100); C is apical meristem of soybean at reproductive growth stage (×50); D is further developed pistil primordia and stamen primordia (×50)。

图 1 大豆营养顶端和生殖顶端纵切解剖图

Fig. 1 The micrographs of straight-section of shoot apical meristem structure of soybean at vegetative and reproductive stage

2.2 生殖生长阶段

生殖生长阶段指花序分化及花芽的分化。生殖生长初期,营养顶端转变为生殖顶端,与前期相比,顶端变成伸长的圆顶形,开始分化苞片和花原基,进入了花序分化阶段(图1C)。这与前人的研究结果类似^[3,7]。随后,早期分化的花原基便开始分化花器官。花器官的分化次序依次为花萼、花瓣、雄蕊、雌蕊。雌蕊原始体进一步分化柱头、花柱、子房,雄蕊原始体分化为花药和花丝(图1D)。最后传粉、受精、开花、结实。

3 讨论

顶端分生组织幼嫩,而大豆叶片茸毛相对坚硬,给制片带来困难。因此,在取生长点时,一定要尽可能剥去外层小叶片,使材料尽可能小。如果外层叶片未剥净,较成熟的茸毛浸蜡后会变硬,在切片时会材料上留下擦痕,使整个制作失败。另外,为了固定充分,固定时要抽气,使材料沉于容器底部。

脱水时从95%乙醇到100%乙醇中,放置的时间不能过长,时间太长会使材料变脆,以后会在切片时增加困难。因此在白天不能完成脱水时,可将材料放在80%或70%乙醇任意一级中过夜。但如果长时间保存只能放在70%乙醇中。经乙醇脱水后,材料加入二甲苯中,如果产生乳白色,表明材料脱水不彻底,应该倒回重新脱水,否则切片呈雨雾状,难以镜检^[8]。浸蜡的时间要适当,时间过长,易导致组织脆硬,切片破碎;时间过短,浸蜡不足,也影响切片效果。一般情况下,如果当天不能完成浸蜡,可在2/3二甲苯+1/3石蜡溶液(40℃)中放置过夜。包裹的时间要尽量缩短,否则引起蜡块的温度差,影响石蜡浸入组织的均匀度^[6]。另外,切片时切片刀必须研磨锋利,没有缺口。切片最大障碍就是刀钝或刀口受损,刀钝会使蜡带翻卷、出现条纹、纵裂。切片过程中,刀口还应经常用二甲苯擦拭,以保持清洁,不干净的刀口也会使切片出现划痕或蜡片贴在刀上。

分色是最为关键的步骤,也是较难掌握的步骤。苏木精染色时间不能过长,否则分色困难。要求2%铁矾水溶液分色至细胞核呈中灰色,细胞质中无

色。这要求不断的从2%铁矾水溶液拿出在显微镜下检查,但重复太久片子易脱落。所以制作开始时最好以少量材料先尝试,然后再大量制作^[9]。经多次尝试后,用2%铁矾分色15 min左右,再水洗30 min就可达到较理想的效果。最好用流水洗净2%铁矾,如果洗不彻底,制好的片子会褪色。

复染的常规方法是用桔红G丁香油饱和液滴染。滴染的时间为1~3 min,但由于浓度高,容易染过。结果得出用6 mL左右桔红G加入1/2二甲苯+1/2乙醇溶液的染色缸中进行染色,约15 min即可,也可适当加大桔红G丁香油饱和液的浓度,减少染色时间。

参考文献

- [1] 蒋青,李扬汉.有限型和无限型大豆的解剖初探[J].大豆科学,1990,9(3):213-219. (Jiang Q, Li Y H. Anatomical study on the determinate and indeterminate soybeans [J]. Soybean Science, 1990,9(3):213-219.)
- [2] 王连铮,王金陵.大豆遗传育种学[M].北京:中国科学出版社,1992:88-89. (Wang L Z, Wang J L. Genetics and breeding of Soybean [M]. Beijing: Science Press, 1992:88-89.)
- [3] 董钻.大豆栽培生理[M].北京:中国农业出版社,1995:19-20. (Dong Z. Soybean cultivation physiology [M]. Beijing: Agricultural Press, 1995:19-20.)
- [4] Washburn C F, Thomas J F. Reversion of flowering in *Glycine Max* [J]. American Journal of Botany, 2000, 87(10):1425-1438.
- [5] 徐运远,种康,许智宏,等. RNA原位杂交实用技术[J].植物学报,2002,19(2):234-238. (Xu Y Y, Chong K, Xu Z H, et al. The practical technique of in situ hybridization with RNA probe [J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 19(2):234-238.)
- [6] 郑国昌.生物显微技术[M].北京:人民教育出版社,1978:58-82. (Zheng G C. Biological microtechnique [M]. Beijing: People Education Press, 1978:58-82.)
- [7] Kuniyuki S, Sachiko I, Toshiro K. Differentiation and developmental stage of floral organs as influenced by nodal position on stem and raceme order in a determinate type of soybean [J]. Crop Science Society of Japan, 1998, 67(1):85-90.
- [8] 曾小鲁.实用生物学制片技术[M].北京:高等教育出版社,1989:76-77. (Zeng X L. The practical technique of making slices [M]. Beijing: Higher Education Press, 1989:76-77.)
- [9] 李正理.植物制片技术[M].北京:中国科学出版社,1987:90-92. (Ling Z L. The technique of plant slices [M]. Beijing: Science Press, 1987:90-92.)