

# 冰冻切片技术在海滨锦葵细胞学研究中的应用

李贺, 刘松梅, 孙艳, 阮成江\*

(大连民族学院 生物技术与资源利用国家民委教育部重点实验室, 辽宁 大连 116600)

**摘要:** 为解决普通石蜡切片观察植物样品繁琐与耗时长的问题, 利用改进的蔗糖保护—液氮速冻切片法, 进行海滨锦葵不同器官细胞学研究。结果表明: (1) 适合于海滨锦葵不同器官的最适蔗糖浓度不同, 适于含水量较大的营养器官(根、茎和叶)的最适蔗糖浓度比含水量较小的花器官(柱头裂片、花柱、子房和花药)高。(2) 利用最适蔗糖浓度的蔗糖保护—液氮速冻切片方法, 获得了完整而清晰的海滨锦葵各器官组织细胞结构的切片; 海滨锦葵具有典型的双子叶草本植物营养器官的组织细胞结构特征, 花柱为闭合型花柱, 子房为多室复子房。表明基于蔗糖保护—液氮速冻的冰冻切片技术在植物细胞学研究中具有广阔的应用前景。

**关键词:** 冰冻切片技术; 海滨锦葵; 蔗糖保护—液氮速冻法

**中图分类号:** Q942.4    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1000-3142(2010)02-0170-04

## Cryosectioning technique for cytological studies in *Kosteletzkya virginica*

LI He, LIU Song-Mei, SUN Yan, RUAN Cheng-Jiang\*

(Key Laboratory of Biotechnology & Bio-Resources Utilization, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China)

**Abstract:** To solve the fussy and long-time consuming problems in observing general paraffin sections of plant specimens, the method combining sucrose-protecting and liquid nitrogen frozen was used to study on cytology of different organs of *Kosteletzkya virginica*. The results showed: (1) It is different for the different organs of *K. virginica* to optimal sucrose concentration. Optimal sucrose concentrations for more water content organs (root, stem and leaf) are higher than that of less water content organs (stigma lobe, style, ovary and anther); (2) By the cryosectioning method of combining sucrose-protecting of optimal concentration with liquid nitrogen quick frozen, the integral and clear cryosections were obtained, which could discriminate from organizational and cellular structures of different organs in *K. virginica*. This indicated *K. virginica* has typical structure characteristics of tissue cell of vegetative organs in dicotyledonous herbaceous plants. Its style belongs to solid style and ovary is multilocular ovaries. Cryosectioning technique combining sucrose-protecting and liquid nitrogen quick frozen is useful for investigating plant cytology.

**Key words:** cryosectioning technique; *Kosteletzkya virginica*; sucrose-protecting and liquid nitrogen quick frozen method

海滨锦葵 (*Kosteletzkya virginica*) 为锦葵科海滨锦葵属多年生草本植物, 集油料、饲料、医药和观赏价值于一身 (阮成江等, 2004, 2005; 郑熙等, 2007), 对其进行细胞学研究有重要理论价值与实践意义。常规石蜡切片从取材固定到封片制成玻片标

本常需数日 (林月惠等, 2001), 而冰冻切片可缩短常规石蜡切片缓慢而复杂的处理过程, 减少对样品组织结构的损伤, 更好地保存生物分子的活性 (陈丹等, 2005)。本研究以海滨锦葵为材料, 使用冰冻切片技术研究其根、茎、叶以及花器官不同部位的组织细胞

收稿日期: 2008-08-26    修回日期: 2009-07-21

基金项目: 国家自然科学基金 (30500071) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500071)]

作者简介: 李贺 (1975-), 女, 辽宁大连人, 硕士, 主要从事植物分子育种研究, (E-mail) lihe@dlnu.edu.cn.

\* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: ruan@dlnu.edu.cn)

结构,这不仅可为海滨锦葵发育生物学、组织免疫学、分子生物学等方面的研究提供技术支持,而且可为冰冻切片技术在植物学研究中的应用提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验用海滨锦葵(*Kosteletzkya virginica*)为种植于大连民族学院温室内的一年生植株,研究材料为其根、茎、叶、花药、柱头、柱头裂片、花柱和子房。取材时期分别为:根、茎、叶取自生长3个月左右的植株;花药采自开花当天即将开裂的花粉囊;柱头、柱头裂片、花柱、子房采自开花当天未授粉花。

### 1.2 最适蔗糖浓度选择

切取适当大小的新鲜组织投入含4%多聚甲醛、2.5%戊二醛、10 mmol/L磷酸缓冲液(PBS, pH7.2)的固定液中,经2~3 h真空处理后,于4℃下继续固定5~6 h或过夜。样品经磷酸缓冲液浸洗2~3次后在由低到高(2%~20%)的蔗糖-磷酸缓冲液中逐级渗透,每级浓度的渗透时间为30 min。再分别取经每级浓度蔗糖溶液渗透的样品直接用包埋剂包裹在样品坩上,置于-20℃的切片机中恒温切片(切片机型号:Leica CM 1100),切片厚度为10 μm。切片自然晾干后在Olympus BX51显微镜下观察。通过比较切片效果选择适于不同器官的最适蔗糖浓度。

### 1.3 冰冻切片

将切取的新鲜组织立即投入含最适蔗糖浓度的固定液中固定(处理条件同1.2),然后用含有相同蔗糖浓度的磷酸缓冲液浸洗2~3次后直接包埋,并迅速在液氮中冷冻约20 s。经冷冻后的包埋块在-20℃下回温约0.5 h后切片(切片条件同1.2)。切片自然晾干后用0.05%甲苯胺蓝染色或不染色,Olympus BX51显微镜下观察并摄影。

## 2 结果与分析

### 2.1 最适蔗糖浓度

不同植物组织细胞结构不同,在冰冻切片过程中选择最适蔗糖浓度至关重要。适合于海滨锦葵不同器官的最适蔗糖浓度各不相同(表1),适于含水量较大的营养器官(根、茎和叶)的最适蔗糖浓度比含水量较小的花器官(柱头裂片、花柱、子房和花药)

高。属于花器官的柱头处于花粉可授阶段,表面湿润,适合柱头的最适蔗糖浓度与含水量较高的营养器官相近。

表1 海滨锦葵不同器官的最适蔗糖浓度

Table 1 Optimal sucrose concentration for different organs of *Kosteletzkya virginica*

器官 Organ	最适蔗糖浓度(%) Optimal sucrose concentration
根 Root	8~10
茎 Stem	18~20
叶 Leaf	10~12
柱头 Stigma	18~20
柱头裂片 Stigma lobe	6~8
花柱 Style	4~6
子房 Ovary	2~6
花药 Anther	4~6

### 2.2 营养器官的冰冻切片

蔗糖保护-液氮速冻法用于海滨锦葵营养器官的冰冻切片获得了良好的切片效果,组织细胞结构完整而清晰(图版I)。

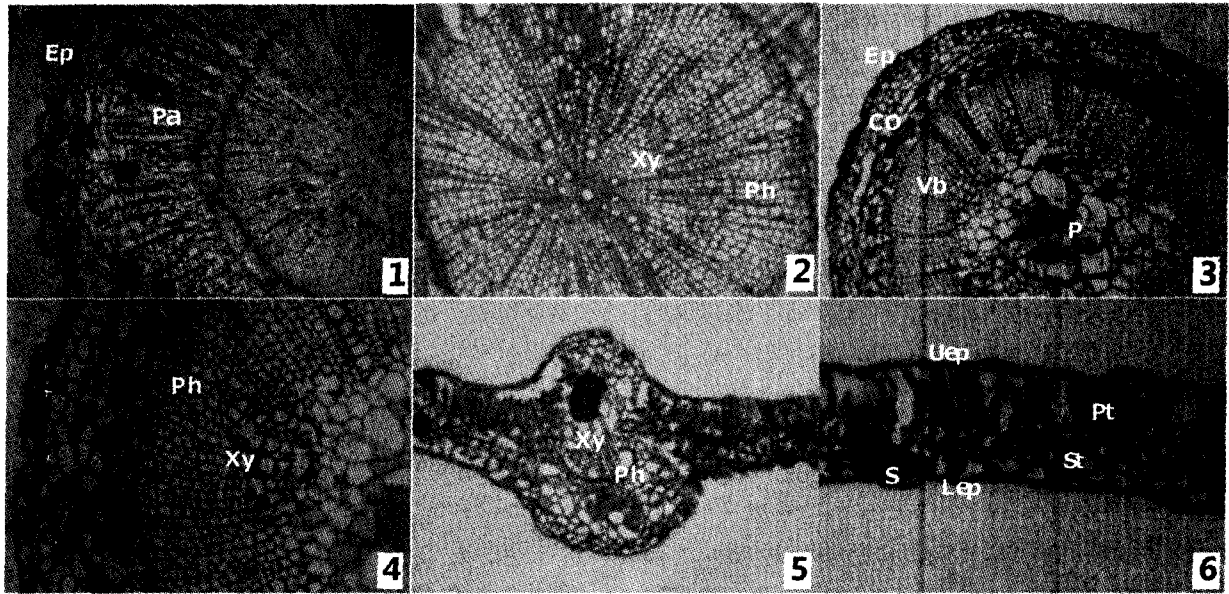
海滨锦葵初生根(图版I:1)的表皮由一层大小相近、排列紧密的细胞组成,外壁具一层厚的角质层,向外有根毛衍生。皮层由8~10层形状不规则的薄壁细胞组成。中柱由中柱鞘、初生木质部和初生韧皮部组成(图版I:2)。初生韧皮部与初生木质部相间排列,其细胞排列形态呈放射状。

茎的初生结构由表皮、皮层和维管柱组成(图版I:3,4)。表皮由大小相似、排列紧密、略呈方型的一层细胞组成,外壁覆有很薄的角质层。皮层分为外皮层和皮层薄壁组织两部分。外皮层位于皮层最外侧,由1~2层较小细胞组成,其内侧为3~4层类圆形薄壁细胞组成的薄壁组织。维管柱由维管束、髓射线和髓组成。维管束为外韧维管束,呈单轮环状排列,由初生木质部、初生韧皮部和束中形成层组成。髓射线是位于两个维管束之间连接皮层与髓的薄壁细胞,由于初生维管组织排列成近似圆筒状,髓射线有些难于辨认。髓区所占比例较大,由排列疏松的大型薄壁细胞组成,随着茎的发育,髓薄壁细胞不断破毁,致使成熟茎的中央形成髓腔。

叶由表皮、叶肉和叶脉三部分组成(图版I:5)。表皮分上、下表皮,各由一层大小不一的细胞组成,覆有较薄的角质层;有气孔分布,属无规则型。叶肉具栅栏组织和海绵组织之分(图版I:6),二者占叶肉厚度比例约为4:3。栅栏组织细胞呈长柱型,排列较紧密,似栅栏状,细胞内含有大量叶绿体。海绵

组织细胞呈不规则排列,较疏松,常形成一些气隙结构,细胞内也存在叶绿体,但数量比栅栏组织少。叶脉处叶片的上下面都有明显的凸出。从横切面看,

叶脉由表皮、基本组织(厚角组织和薄壁组织)和中央维管束组成。维管束为外韧维管束,木质部和韧皮部之间有不发达的形成层。



图版 I Ep:表皮; Pa:薄壁组织; Xy:木质部; Ph:韧皮部; Co:皮层; Vb:维管束; P:髓; Uep:上表皮; St:海绵组织; Pt:栅栏组织; S:气孔; Lep:下表皮。1. 海滨锦葵根横切片,×50; 2. 根中部横切片,×100; 3. 茎横切片,×100; 4. 茎横切片,×200; 5. 叶片经过中脉部分的横切片,×100; 6. 叶片横切片,×200。

Plate I Ep:Epidermis; Pa:Parenchyma tissue; Xy:Xylem; Ph:Phloem; Co:Cortex; Vb:Vascular bundle; P:Pith; Uep:Upper epidermis; Pt:Palisade tissue; St:Spongy tissue; S:Stoma; Lep:Lower epidermis. 1. Transverse section of root of *Kosteletzkya virginica*,×50; 2. Transverse section of centre portion of root,×100; 3. Transverse section of stem,×100; 4. Partially magnifying section of stem from 3,×200; 5. Traverse section of leaf past vein,×100; 6. Partially magnifying section of leaf from 5,×200.

上述结果表明,海滨锦葵具有典型的双子叶草本植物营养器官的组织细胞结构特征。

### 2.3 花器官的冰冻切片

蔗糖保护一液氮速冻法用于海滨锦葵花器官的冰冻切片获得了良好的切片效果,组织细胞结构完整而清晰(图版 II)。

海滨锦葵底部合生的五柱头裂片伸出单体雄蕊管,形成特殊的柱头探出式雌雄异位。柱头宽大的表面被特化的腺质细胞—乳突覆盖(图版 II:7-9),毛状乳突细胞下分布有排列紧密的数层腺质细胞。与柱头相连的柱头裂片由表皮、皮层和引导组织构成(图版 II:10)。表皮由排列紧密的厚壁细胞组成,皮层由薄壁细胞组成,胞间隙较大,中心是腺质细胞组成的引导组织,细胞排列紧密。花柱(图版 II:11,12)为闭合型花柱,无中空花柱道,中央引导组织细胞直径较小,细胞质浓厚,外周的皮层区由具分泌功能的大型薄壁细胞组成。子房(图版 II:13)为五心皮组成的多室复子房,每室1胚珠,着生于中轴胎座上。子房壁上分布有维管束。花药(图版 II:14)中

部有药隔,两侧各有一个花粉囊,药隔内有维管束,可见数量不等的圆形花粉粒。

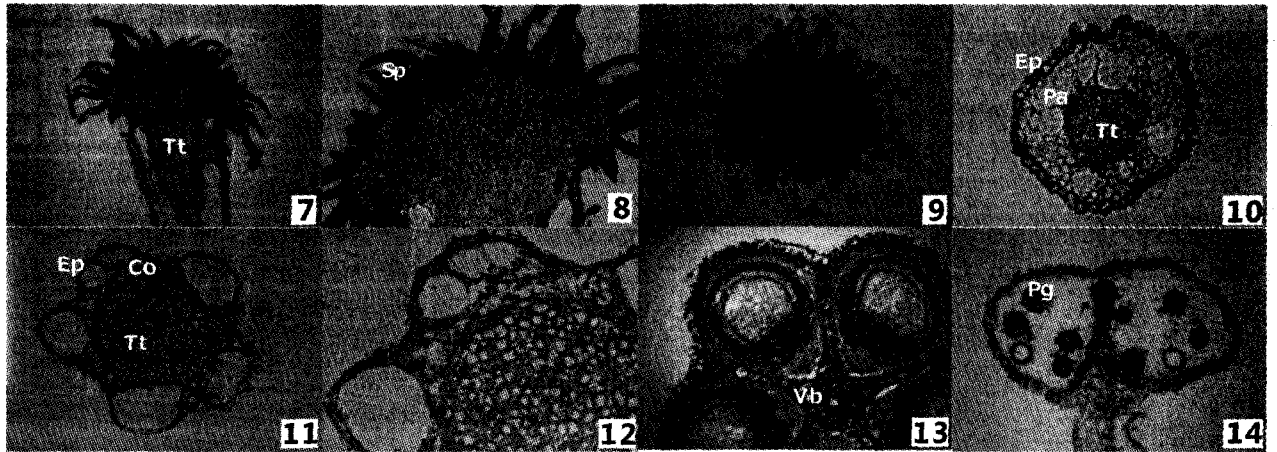
### 3 讨论

冰冻切片技术具有操作简单、制片速度快并能完整保存细胞结构及生物大分子活性(如脂肪、酶等)的特点,在动物和人体的研究中已被广泛应用(Sathyanesan等,2002;Irina等,2003),但仅在少数植物器官和组织切片中应用(万怡震等,2001;Annie等,2002)。植物细胞具有细胞壁和大液泡,其细胞含水量远大于相同体积的动物细胞,常规冰冻切片法易形成冰晶损伤。快速冷冻是解决这一问题的主要措施之一,而使用冷冻保护剂可以降低细胞内溶液的冰点,减小形成冰晶的机会(林月惠等,2001),冷冻保护和快速冰冻相结合的方法从理论上讲能较好的保存植物样品的细胞结构,是未来植物器官切片技术发展的趋势。

植物器官冰冻切片研究中,一些学者采用甘油

作为冷冻保护剂(林月惠等,2001;刘剑峰等,2006),获得了相对木质化、组织含水量较小的植物器官的清晰切片;另一些学者(陈丹等,2005)选用蔗糖作为冷冻保护剂,也获得了理想的冰冻切片。甘油价格较蔗糖昂贵,且不适用于各种植物组织器官(陈丹等,2005),但利用蔗糖作为冰冻保护剂时,最适蔗糖

浓度是影响切片效果的关键,蔗糖浓度过高,细胞易收缩变形,蔗糖浓度过低则达不到冷冻保护的作用。例如,陈丹等(2005)对烟草顶芽冰冻切片的研究表明,蔗糖浓度为 40% 时,虽然芽整体结构保持较完整且分生组织不受影响,但分生组织周围的薄壁细胞却有不同程度收缩;当蔗糖浓度为 10% 时薄壁细



图版 II Tt: 引导组织; Sp: 表面乳突; Ep: 表皮; Pa: 薄壁组织; Co: 皮层; Vb: 维管束; Pg: 花粉粒。7. 海滨锦葵柱头纵切片,  $\times 100$ ; 8. 柱头纵切片,  $\times 200$ ; 9. 柱头横切片,  $\times 100$ ; 10. 柱头裂片横切片,  $\times 200$ ; 11. 花柱横切片,  $\times 200$ ; 12. 花柱横切片,  $\times 400$ ; 13. 子房横切片,  $\times 50$ ; 14. 花药横切片,  $\times 100$ 。

Plate II Tt: Transmitting tissue; Sp: Surface papilla; Ep: Epidermis; Pa: Parenchyma tissue; Co: Cortex; Vb: Vascular bundle; Pg: Pollen grain. 7. A longitudinal section of stigma of *Kosteletzkya virginica*,  $\times 100$ ; 8. An enlargement of stigma,  $\times 200$ ; 9. A transverse section of stigma,  $\times 100$ ; 10. A transverse section of stigma lobe,  $\times 200$ ; 11. A transverse section of style,  $\times 200$ ; 12. A partially magnifying section of style from 5,  $\times 400$ ; 13. A transverse section of ovary,  $\times 50$ ; 14. A transverse section of anther,  $\times 100$ .

胞能保持原状,但芽的整体结构保持不完整。

本研究选择蔗糖作为冰冻保护剂,优选确定的适于海滨锦葵器官的最适蔗糖浓度与陈丹等(2005)对 4 种植物花器官实验所得结果相近。我们对陈丹等(2005)建立的蔗糖保护一液氮速冻法进行了一些改进,获得了组织细胞结构完整且能保持原状的植物器官切片。根据海滨锦葵的营养器官硬度较大,延长了 1 h 的真空处理和 2 h 的固定时间,使固定液更好地渗入组织细胞中,应用于花器官取得了良好效果;根据实际情况将回温时间缩短为 0.5 h,避免了组织细胞的大量破损,获得了结构完整且清晰的切片。本研究首次对多年生草本盐生植物海滨锦葵营养器官的结构进行了详细分析,确定了闭合花柱、引导组织等花部特征,为其授精机制提供了细胞学方面的实验依据。

目前,冰冻切片技术在植物免疫组织化学、原位杂交及酶定位等研究中已被广泛应用(Morin 等,1997;Gierth 等,1999)。尤其在免疫组织化学染色中,冰冻切片能较好地保存细胞的抗原性;冰冻切片方法结合免疫荧光标记技术应用于植物微管骨架的

研究也取得了很好的效果(张新成等,2008)。本研究表明,改进的蔗糖保护一液氮速冻法适合于植物细胞学研究,而且此方法操作简单,实验周期短,对植物冰冻切片技术的推广具有重要意义。

#### 参考文献:

- Annie J, Nathalie D, Walter D, *et al.* 2002. In situ localisation of cytokinins in the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral transition[J]. *Planta*, **214**:970-973
- Chen D(陈丹), Zhao J(赵洁). 2005. Suitable cryosectioning technique in floral organs of plants(适合于植物花器官的冰冻切片技术)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), **23**(3):285-290
- Gierth M, Stelzer R, Lehmann H. 1999. An analytical microscopical study on the role of the exodermis in apoplastic  $Rb^+$  ( $K^+$ ) transport in barley roots[J]. *Plant and Soil*, **207**:209-218
- Inada N, Wildermuth MC. 2005. Novel tissue preparation method and cell-specific marker for laser microdissection of *Arabidopsis* mature leaf[J]. *Planta*, **221**:9-16
- Irina GM, Michael MM, Louis G, *et al.* 2003. Decreased NPY innervation of the hypothalamic nuclei in rats with cancer anorexia [J]. *Brain Research*, **961**:100-108
- Lin YH(林月惠), Li HB(李寒冰), He XQ(贺新强). 2001. Application of cryo-sectioning technique in highly lignified tissues (下转第 184 页 Continue on page 184)

## 3 讨论

对于腐生真菌,从子实体的组织分离获得分离物,其分离物可靠性的验证最直接的方法是用该分离物进行栽培出菇验证。但是对多数菌根真菌由于其营养生理的特殊性,在纯人工条件下还无法进行出菇验证,而形态学和细胞学鉴定结果可靠性较差,因此用传统方法对菌根真菌分离物的鉴定就比较困难。现代分子生物学的发展,特别是基因碱基序列分析技术的应用,为菌根性真菌菌种的鉴定提供了可靠、方便的技术手段(张志华等,2006)。而 ITS 序列分析因其保守性强,受环境因素影响较小(廖德聪等,2005)更成为其中的常用方法。刘春卉等(2007)对金耳及其近似种的鉴定,熊涛等(2006)对松乳菇的鉴定,王桂文等(2004)对红菇的鉴定,李海波等(2007)对鹅膏菌的鉴定,所有这些都证明 ITS 序列已成为大型真菌菌种鉴定的重要工具。

我们通过 ITS 序列比较研究证明获得了真正的松茸菌种,为后续的松茸菌丝体的营养生理特性,松茸人工和半人工栽培试验,松茸菌丝体液体发酵及代谢,原生质体单核化研究及交配型等遗传研究提供了可靠的材料。

## 参考文献:

- 弓明钦,仲崇禄,陈羽,等. 2007. 菌根型食用菌及其半人工栽培[M]. 广州:广东科技出版社,90—100
- 弓明钦,陈羽,王凤珍,等. 1999. 松茸[M]. 昆明:云南科技出版社,10—26
- 张志华,洪葵. 2006. 核酸序列直接分析在真菌鉴定方面的应用[J]. 生态学报,12(2):39—43
- 吴映明,陈爱葵,曾小龙,等. 2003. 松口蘑的镇咳,祛痰,平喘作用研究[J]. 中国食用菌,22(4):37—40
- 袁天凤,段彬,秋道持,等. 2006. 松茸的地理分布与生态研究[J]. 中国食用菌,25(4):14—17
- 廖德聪,陈强,李登煜,等. 2005. 四川省雅江松茸菌的分离与系统发育[J]. 生态学报,25(4):791—794
- Li HB(李海波),Wu XQ(吴学谦),Wei HL(魏海龙), et al. 2007. A primary studies on classification and identification of seven *Amanita* species based on morphological characteristics and ITS sequences of rDNA(基于形态特征和 ITS 序列对 7 个鹅膏菌属菌株的分类鉴定)[J]. *J Fungal Res*(菌物研究),5(1):14—19
- Liu CH(刘春卉),Qu WJ(瞿伟菁),Zhang W(张雯). 2007. Analyses of *Tremella aurantialba* (Tremellaceae) and its analog species inferred from ITS sequences(金耳与其近似种的 rDNA-ITS 序列分析)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究),29(2):237—242
- Mankel A, Kost G, Kothe E. 1999. Re-evaluation of the phylogenetic relationship among species of the genus *Tricholoma* [J]. *Microbiol Res*, 153(4):377—388
- Wang GW(王桂文),Sun WB(孙文波). 2004. Nucleotide sequence analysis on ITS rDNA of fruitbodies and isolates of *Russula* in Guangxi(广西红菇子实体及分离株的 rDNA-ITS 序列分析)[J]. *Guangxi Sci*(广西科学),11(3):261—265
- White TJ, Bruns TD, Lee S, et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [C]//Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ(eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press:315—322
- Xiong T(熊涛),Xiao M(肖满),Zeng ZL(曾哲灵), et al. 2006. Molecular identification of isolate of *Lactarius deliciosus* by ITS analysis(松乳菇组织分离菌株的 rDNA-ITS 序列分子鉴定)[J]. *Microbiology*(微生物学通报),33(4):1—4
- (高度木质化材料的冰冻切片技术)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报),18(1):118—120
- Liu JF(刘剑峰),Yan XF(阎秀峰),Cheng YQ(程云清), et al. 2006. Application of cryosectioning technique to cytology studies of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. (冰冻切片技术在高山红景天细胞学研究中的应用)[J]. *J Northeast Fore Univ*(东北林业大学学报),34(7):110—119
- Morin KX, Soll J. 1997. Immunogold labeling of cryosectioned pea chloroplasts and initial localization of the proteins associated with the protein import machinery[J]. *Planta*, 201:119—127
- Ruan CJ(阮成江),Qin P(钦佩),Chen JW(陈景文), et al. 2004. Analysis of nutritive compositions in the seeds of *Kosteletzkya virginica* (海滨锦葵种子营养成分分析)[J]. *Acta Agron Sin*(作物学报),30(9):901—905
- Ruan CJ(阮成江),Qin P(钦佩),Han RM(韩睿明), et al. 2005. Identification of hybrids of *Kosteletzkya virginica* using AFLP markers(AFLP 分子标记鉴定海滨锦葵杂交后代上的应用)[J]. *J Nanjing Fore Univ: Nat Sci Edi*(南京林业大学学报:

- 自然科学版),29(1):20—24
- Sathyanesan SN, Antonia D, Rose T, et al. 2002. A simplified method for combined immunohistochemistry and in-situ hybridization in fresh-frozen, cryocut mouse brain sections[J]. *Brain Research Protocols*, 9:214—219
- Wan YZ(万怡震),He PC(贺普超). 2001. The technic parameters of slicing vitis berries by freezing-microtome(葡萄浆果冰冻切片技术参数的研究)[J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*(西北植物学报),21(2):382—386
- Zhang XC(张新成),Li ZG(李志刚),Li SL(李素丽), et al. 2008. Cryosectioning method for the observation of microtubule cytoskeleton in plant cells(冰冻切片法在植物微管骨架研究中的应用)[J]. *Guihaia*(广西植物),28(2):164—166
- Zheng X(郑熙),Wang XY(王学英),Shan Y(单莹), et al. 2007. Callus induction and plant regeneration from embryo exes of *Kosteletzkya virginica* (海滨锦葵胚轴愈伤组织诱导及植株再生)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报),24(2):194—199

(上接第 173 页 Continue from page 173)