

文章编号:1674-7054(2014)02-0162-04

巴西橡胶树树皮环氧树脂组织切片及染色技术

徐静文, 廉文君, 曹玉鑫, 夏志辉, 黄 惜

(海南省热带生物资源可持续利用重点实验室/海南大学 农学院, 海南 海口 570228)

摘 要: 介绍以环氧树脂为包埋介质, 不需要碘溴染色、用于光学显微镜的巴西橡胶树半薄切片技术, 详述固定、脱水、渗透、包埋、聚合、切片、染色及封片各程序。利用3种不同的染料能充分区分橡胶乳管细胞、木质部、形成层、导管、次生韧皮射线、初生韧皮纤维、皮层和表皮等, 还能观察到许多在石蜡切片上不容易区分的细胞及其内部结构, 如树皮表皮细胞下富含的丹宁细胞和叶绿体等。该技术是对巴西橡胶树石蜡包埋切片技术的改进和扩展。

关键词: 巴西橡胶树; 环氧树脂; 组织切片; 染色

中图分类号: Q 246

文献标志码: A

巴西橡胶树的乳管是天然橡胶合成和贮存的组织, 是决定橡胶产量最重要的结构。橡胶树乳管列数受遗传和环境双重因素影响。利用光学显微镜观察乳管的方法通常是碘溴染色结合石蜡包埋的植物组织切片法。郝秉中等在1982年首次利用该方法发现采胶能够促进乳管分化^[1]。他们还证明, 在机械损伤但并不排胶的条件下, 也能诱导乳管分化^[2]。2000年, 郝秉中和吴继林发现外施茉莉酸或茉莉酸生物合成的前体亚麻酸可以诱导形成层分化形成正常的次生乳管列, 而外施其他激素, 如细胞分裂素、生长素、脱落酸、乙烯和水杨酸等都不能诱导乳管分化, 证明茉莉酸可能是橡胶树体内调控乳管分化的重要信号分子^[3]。另外, 机械伤害可以诱导乳管分化和茉莉酸生物合成抑制剂的阻断, 表明机械伤害的作用是通过它在橡胶树体内诱导形成茉莉酸的结果。这一发现对于天然橡胶生产和发展橡胶树化学调控技术提供了理论根据^[4-5]。碘溴染色和石蜡包埋的植物组织切片法程序繁复, 耗时较长。陈永哲等人使用Epon812和国产600环氧树脂做包埋剂对植物细胞学和组织学的研究, 克服了石蜡包埋切片技术的缺点^[6]。在此基础上, 笔者改进环氧树脂包埋切片技术, 并将其应用于巴西橡胶树在光学显微镜下的乳管观察, 采用不同染料进行染色实验对比, 取得了良好的效果。

1 材料与方法

1.1 材料 2年生热研7-33-97巴西橡胶树萌条树皮。

1.2 方法

1.2.1 树皮组织材料固定及脱水 采用戊二醛-锇酸双重固定法固定组织, 因锇酸较难渗入组织块内部的细胞中, 故将材料切成约5 mm × 5 mm × 1 mm的薄片。用刀片将树皮切下来, 先用 $\varphi = 2\%$ 的戊二醛过夜固定。 $\varphi = 2\%$ 的戊二醛固定后用0.2 mol · L⁻¹ pH7.2 PBS Buffer冲洗3次, 每次15 min; 然后用 $\varphi = 1\%$ 的锇酸固定2 h, 锇酸处理后样品变黑。固定液均用0.2 mol · L⁻¹ PBS Buffer pH7.2配制。采用乙醇为脱水剂, 在室温下经体积分数为30%、50%、70%、80%、95%、100% (2次)的乙醇逐级脱水, 每次15 min。

收稿日期: 2014-02-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060107, 31260170); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金博导类项目(20104601110003, 20114601110003)

作者简介: 徐静文(1992-), 女, 海南大学农学院生物技术系2011级本科生。

通信作者: 黄惜, 男, 研究员, E-mail: xihuang@hainu.edu.cn

1.2.2 渗透和包埋 采用 Epon812 环氧树脂包埋剂为渗透包埋剂。将 A 液(Epon812 10 mL)和 B 液[Epon812 10 mL + DDSA(十二烷基丁二酸酐) 16 mL + MNA(甲基丙烯腈) 8.9 mL]按 $V_{A液}:V_{B液}=1:4$ 的比例混合,待上述 2 种液体混匀后,在充分搅拌中按 1.5%~2% 的体积比,滴加 DNP-30。

对材料进行渗透操作:用环氧丙烷渗透 2 次,每次 15 min;用环氧丙烷 + Epon812 等比例混合液渗透 2 h(室温);用环氧丙烷 + Epon812 按 1:2 比例(体积比)混合并渗透 2 h(室温);用纯 Epon812 渗透 2 h(室温)。

将渗透后的材料置于盛有 Epon812 环氧树脂包埋剂的小培养皿中,盖上盖子,室温下静置过夜。为保证后续切片操作的完整性与便捷性,需用镊子将材料排列整齐,并使其悬浮在包埋剂中,不接触容器侧壁或底面,且包埋时动作要轻巧,避免产生气泡影响切片。

1.2.3 聚合 将材料依次在 37、45、60 ℃ 的烤箱中放置 24 h,使其发生聚合反应,期间材料薄片可能发生漂浮,应适当用镊子调整材料位置使其保持排列整齐的状态。

1.2.4 切片 聚合完成后对包埋块进行切割修整,用器械将小培养皿玻璃外壳去掉,用锉刀打磨包埋块,使其大小、厚度适宜,用切片机进行切片。用切片机切取 5~10 μm 的切片,每切 1 张后直接用细镊子从刀口上拾取。切片速度需适中,速度太快切片不完整,速度太慢会导致材料碎裂。在洁净的载玻片上滴一滴蒸馏水,将切片小心平放在水滴表面,然后用酒精灯适当加热,借助较高温度和水的表面张力使切片展开。用滤纸吸去多余水分,在酒精灯上适当加热,用余热使切片平展地附着在载玻片上。由于切片对载玻片有一定的附着能力,因此,在后续染色过程中不会脱落。切片时应尽量选择较厚的材料以保证橡胶树皮细胞组织结构的完整性。

1.2.5 染色和封片 切片中环氧树脂包埋介质不仅不会影响材料的染色,而且有利于保存细胞内部的细微结构,因此,在染色时不需要将包埋剂溶去。本实验主要采用藏红、固绿、亚甲蓝 3 种染料对环氧树脂切片进行染色。分别将 0.01 g 上述 3 种染料溶于 10 mL 乙醇中配制成染液,在切片上滴 1~2 滴染液,在酒精灯上稍稍烤一下,使染液保持在 60 ℃ 左右,2~3 min 后即可用水轻轻漂洗以洗去染液,在光学显微镜下观察。固绿染料染色较困难,染色时间为 10~20 min。环氧树脂切片可以不封片就进行观察,但用中性树脂进行封片可以消除或减轻包埋块上轻微刀痕及包埋剂与材料之间的缝隙对观察产生的干扰,能够更加清晰地观察到各种细胞结构及其细胞器,且封片后切片不易褪色可永久保存。

2 结果与分析

环氧树脂半薄切片的厚度比石蜡切片的薄得多,再加上切片、固定及染色技术的改进,使许多原来在光学显微镜下用石蜡切片看不清或甚至完全看不见的细胞结构显示得更清晰。笔者采用藏红、固绿、亚甲蓝 3 种不同染料染色,以便更好地区分橡胶乳管细胞、木质部、形成层、导管以及内含成分不同的细胞和亚细胞结构。

2.1 藏红染色 番红(Safranin O)是从藏红花柱头中提取的一种天然染色剂,番红能够对植物的木质化、栓质化和胶质化部分进行染色,染色后的部分为红色。从用藏红染料染色的橡胶树幼茎树皮的横切面显微图(图 1A)中可见,染色最深的是初生韧皮纤维,纤维细胞紧密排列成弯曲条带状。初生乳管被钨酸染成黑色,乳管周围的胞壁着色明显深于其他韧皮细胞。在表皮细胞下,大量细胞被染成黑色,可能是含有单宁的韧皮细胞。巴西橡胶树幼茎树皮的表皮细胞下富含丹宁细胞鲜见报道,只在 2013 年的会议文集摘要中提及^[7]。在纵切面显微图(图 1B)中,鲜红色的初生韧皮纤维没有明显的断层,呈现连续整齐条带状排列,较其他细胞染色较深。乳管细胞行列之间已形成一个相互连接但又不规则的立体网状系统,说明该树皮幼茎已经完成初生生长,而表皮细胞下大量染成黑色的单宁细胞则无论横切还是纵切,都是被细胞壁分隔开。此外,在表皮下的皮层细胞中观察到大量叶绿体,这说明在幼嫩树皮中存在光合作用。

2.2 固绿染色 固绿(Fast green)是一种染含有浆质的纤维素细胞组织的酸性染料,在细胞和植物组织的染色上应用极广,与苏木精、番红并列为植物组织学上最常用的 3 种染料。但固绿对环氧树脂包埋的橡胶树皮组织染色较难,染色 10~20 min 的效果仍不如藏红和亚甲蓝,着色较浅,仅细胞周围呈现浅绿色,初生韧皮纤维着色较浅,但仍能根据细胞形状分辨出木质部、初生韧皮纤维、形成层等(图 2A)。乳管细胞成黑色,表皮细胞下含有大量黑色的单宁细胞以及紧贴细胞膜分布的叶绿体。在纵切面显微图(图

2B) 中, 表皮下面也可见大量黑色的单宁细胞及含叶绿体的皮层细胞, 乳管细胞互相连接成网状系统。

2.3 亚甲蓝染色 亚甲蓝(Methylene blue)是一种芳香杂环化合物。被用作化学指示剂、染料、生物染色剂。笔者发现亚甲蓝特别适用于环氧树脂包埋的橡胶树皮组织染色, 亚甲蓝染料的染色时间较短, 效果较好, 从着色深浅上能区分韧皮部和木质部结构, 细胞颜色层次感差异明显。在横切图中能够清晰地分辨出表皮、皮层、初生韧皮纤维、木质部、导管、乳管细胞以及形成层等, 初生韧皮纤维被染成较深的深蓝色, 形成层较次生韧皮射线染色更深(图 3A)。在纵切面(图 3B)中, 黑色的乳管细胞互相连接成网状系统; 同时可见大量的单宁细胞以及颗粒状沿细胞膜分布的叶绿体。

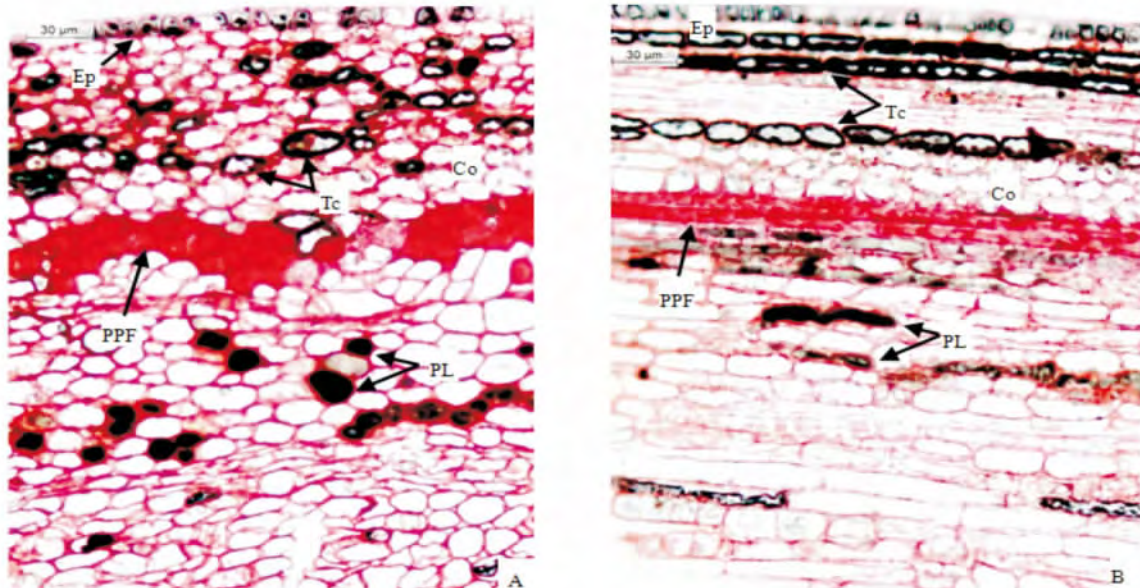


图1 藏红染色的巴西橡胶树萌条树皮组织切片

A:横切面; B:纵切面; Ep:表皮; Tc:单宁细胞; Co:皮层; PPF:初生韧皮纤维; PL:初生乳管

Fig.1 Tissue sections of the barks of the coppice from *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. stained with Safranin O

A: cross section; B: vertical section; Ep: epidermis; Tc: tannin cell; Co: cortical; PPF: primary phloem fiber; PL: primary laticifer

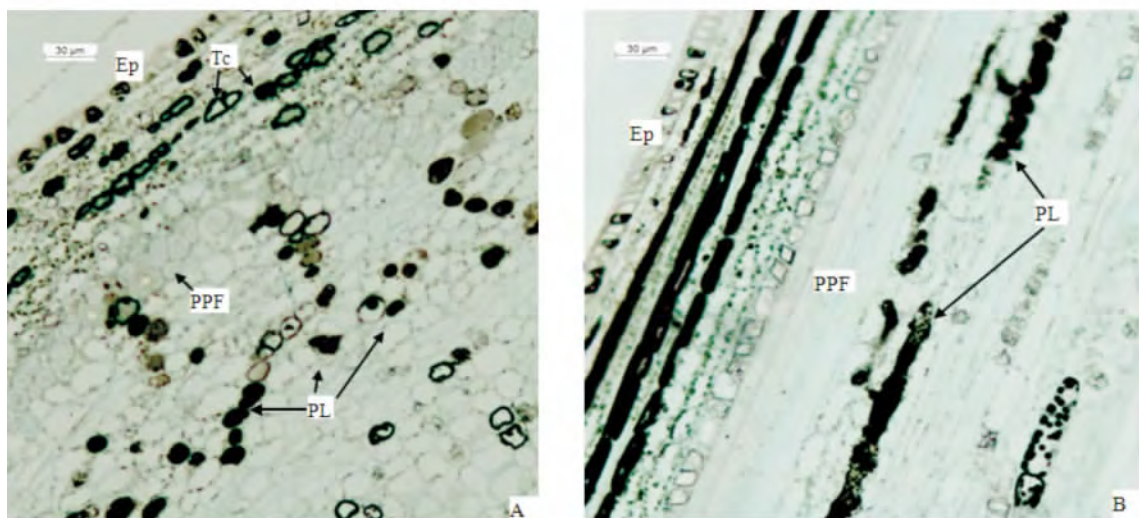


图2 固绿染色的巴西橡胶树萌条树皮组织切片

A:横切面; B:纵切面; Ep:表皮; Tc:单宁细胞; Co:皮层; PPF:初生韧皮纤维; PL:初生乳管

Fig.2. Tissue sections of the barks from the coppice of *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. stained with fast green

A: cross section; B: vertical section; Ep: epidermis; Tc: tannin cell; Co: cortical; PPF: primary phloem fiber; PL: primary laticifer

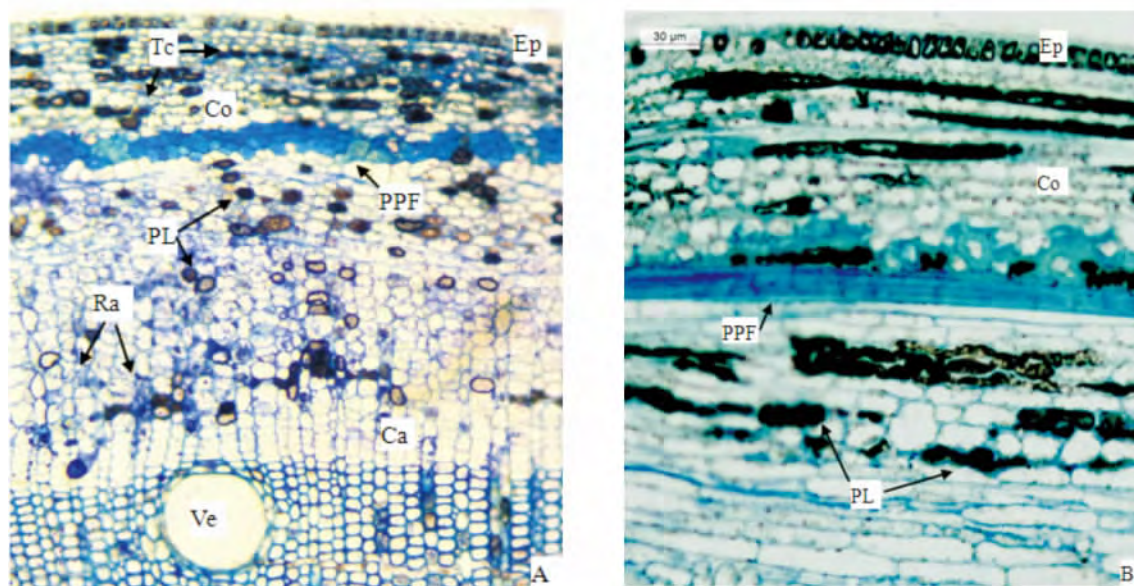


图3 亚甲蓝染色的巴西橡胶树萌条树皮组织切片

A:横切面; B:纵切面; Ep:表皮; Tc:单宁细胞; Co:皮层; PPF:初生韧皮纤维; PL:初生乳管; Ve:导管; Ca:形成层; Ra:次生韧皮射线

Fig. 3. Tissue sections of the barks from the coppice of *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. stained by Methylene blue

A: cross section; B: vertical section; Ep:epidermis; Tc: tannin cell; Co: cortical; PPF: primary phloem fiber; PL: primary laticifer; Ve: vessel; Ca: cambium; Ra: Rosella

3 讨论

用于光学显微镜的巴西橡胶树半薄切片技术对于细胞学和组织学研究是一种非常重要的技术,与巴西橡胶树的石蜡包埋切片技术相比,它不需要碘溴染色,且在切片制作的过程中免除了二甲苯等高溶性有机溶液的脱蜡过程,减少了细胞内含物的损失;同时用不同的染料能够区分不同的细胞类型,例如:番红和亚甲蓝能够对橡胶的纤维化较高的初生韧皮纤维的染色较深,明显区别于其他细胞,而固绿刚好相反,对初生韧皮纤维的染色较其他组织浅,此外,亚甲蓝染色能区分橡胶树皮的韧皮部和木质部,从而将形成层2边的组织染成泾渭分明的2种颜色,具有明显的层次感。塑料半薄切片由于厚度比石蜡切片薄得多,再加上切片、固定及染色不简化,更好地保留了组织器官原本的结构,使许多原来在光学显微镜下用石蜡切片看不清或甚至完全看不见的细胞结构显示得更清晰,如亚细胞结构上的细胞器叶绿体清晰可见。本实验对藏红、固绿、亚甲蓝3种染料的对比结果表明,亚甲蓝对橡胶树皮幼茎的染色效果最好,且染色耗时少、操作简便。此项技术即使没有任何组织切片经验者都非常容易掌握和应用,具有推广价值。

参考文献:

- [1]郝秉中,吴继林. 创伤(割胶)对巴西橡胶树乳管分化的影响[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 1982(4):388-391.
- [2]郝秉中,吴继林,云翠英. 排胶对橡胶树乳管分化的促进作用[J]. 热带作物学报, 1984(2):19-23.
- [3]HAO B Z, WU J L. Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: Induction by exogenous jasmonic acid and linolenic acid[J]. Annals of Botany 2000, 85:37-43.
- [4]曾日中,白先权,黎瑜,等. 外源茉莉酸诱导巴西橡胶树乳管分化的酶学研究(I)[J]. 热带作物学报, 2001(3):17-23.
- [5]ZHU J, ZHANG Z. Ethylene stimulation of latex production in *Hevea brasiliensis* [J]. Plant signaling & behavior 2009 4(11): 1072-1074.
- [6]陈永哲,丁卫建,周俊彦,等. 用于光学显微镜研究的塑料半薄切片[J]. 西北植物研究, 1982(2):139-145, 153-154.
- [7]史敏晶,吴继林,郝秉中,等. 巴西橡胶树树皮单宁细胞结构和发育的研究[C]//中国植物学会. 生态文明建设中的植物学:现在与未来——中国植物学会第十五届会员代表大会暨八十周年学术年会论文集——第3分会场:植物分子生物学与基因组学. 北京:中国植物学会, 2013:1.

(下转第161页)

branch litter production had a seasonal bimodal seasonal curve. The fruit litter showed a unimodal seasonal curve in all the types of forests except in the shrubbery where the fruit litter production had a bimodal seasonal curve. The annual litter production and its composition were not significantly correlated with the stand characteristics in the shrubbery, and the leaf litter production and the annual litter production exhibited a significant correlation ($P < 0.05$) with the stand density in the monsoon elfin forest. The annual litter production and its composition failed to show significant relationship with the terrain factor in the same types of forests in Tongguling mountain.

Key words: forest litter; annual litter production; litter composition; seasonal dynamics; influencing factors

(上接第 165 页)

Epoxy-resin Embedded Tissue Section and Staining of the Barks of *Hevea brasiliensis*

XU Jingwen, LIAN Wenjun, CAO Yuxin, XIA Zhihui, HUANG Xi

(Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources/College of Agronomy, Hainan University,
Haikou 570228, China)

Abstract: Tissue sectioning and staining are basic technologies for dissecting plant tissue and organic structure. Rubber trees (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) are the most important commercial source of natural rubber, and they produce and store latex in laticifers in the bark. Paraffin section stained with I-Br is usually used for observation of laticifer under light microscopy. The procedures of this method are complicated and time-consuming. Therefore, a technology for tissue section with tissue embedded in epoxy resin without using I-Br staining is introduced for laticifer observation under light microscopy, including fixation, dehydration, infiltration, embedding, polymerization, sectioning, staining, and mounting. Laticifer, xylem, cambium, vessel, phloemray radial, primary phloem ray fiber, cortex, and epidermis were well distinguished on the epoxy resin-embedded tissue sections by using 3 different stains. Furthermore, numerous cells and their inclusions that were scarcely observed in paraffin section, such as tannin, chloroplast, etc were also observed on the tissues embedded in epoxy resin. This technology is an improvement in paraffin-embedded tissue section under light microscopy for the bark of the rubber tree.

Key words: *Hevea brasiliensis* Müll. Arg.; epoxy resin; tissue section; staining