

# 几种植物电镜样本的制备技术\*

## TECHNIQUE FOR THE PREPARATION OF THE SAMPLES OF SEVERAL PLANT SPECIES FOR THE OBSERVATION UNDER THE ELECTRON MICROSCOPY

章潜才

Zhang Qiancai

(中心实验室)

(Central Laboratory)

虽然自电镜问世以来,很早就用来研究植物材料的超微结构,但是,由于植物材料具有很厚的细胞壁和许多液胞,加之许多样品的表面具有毛状体或蜡被,因此,制备好一种植物样品用于电镜的观察分析,常耗费植物学工作者许多时间和精力。生物材料电镜技术有过许多专著,但对植物学工作者来说,都不能照搬。针对植物的生物学特征和细胞学特征,近几年来,我们对一些植物材料作了电镜样本制备方面的试验和探讨,并取得一些经验,现分别介绍如下。

### 一、水稻叶片样品制备

水稻叶片表面具有蜡被和硅质晶体,它们对固定液的渗透具有不可忽视的阻碍作用,按常规的生物样品制备方法常常失败。有人提出过象制备石蜡切片样品那样,先用酒精软化组织、再按常规方法固定,但这一方法由于在固定前须作予处理,在这期间,将由于细胞的“自溶作用”,势必导致样品“生活状态”的破坏。为此,在制作水稻叶片时,我们主要采用尽量切小样品,适当地延长固定时间和渗透时间的方法来解决。具体步骤如下:

供试样品:矮仔占、广陆矮、矮脚南特。

制备步骤:取新鲜剑叶,切叶肉组织 $0.5\sim 1\text{ mm}^3$ 大小,迅速放进4%戊二醛固定液中(Milloning氏0.2M磷酸缓冲液配制、pH7.2)作前固定,并抽气使之下沉。固定12~48小时( $0^{\circ}\sim 4^{\circ}\text{C}$ ),甚至可达一个星期。固定后用同一磷酸缓冲液洗涤2小时。(中间换液3~5次),将剩余的戊二醛充分洗涤干净。再用1%的四氧化锇( $\text{OsO}_4$ )作后固定,固定12小时或过夜( $0^{\circ}\sim 4^{\circ}\text{C}$ ),用同样的磷酸缓冲液洗涤一小时后(中间换液2~3次),经逐级渐进的乙醇或丙酮脱水。每级十五分钟,(70%乙醇脱水时可放置过夜)。在70%乙醇脱水前的各个步骤均需在 $0^{\circ}\sim 4^{\circ}\text{C}$ 条件下进行。

\* 本文承农业生物系王世旋付教授、郑玉梅讲师、本室李济和工程师审阅,特此致谢!

环氧丙烷二次过渡(用丙酮脱水的可不用此过渡)，然后分别用3:1、1:1、1:3(环氧丙烷:包埋剂)的渗透剂渗透三天三夜,再换纯包埋剂渗透过夜,用环氧树脂618包埋剂包埋,放进恒温箱中45°C聚合24小时,60°C再聚合24小时,修块后用玻璃刀在LKBV型超薄切片机上切片,厚度约600~800 Å,捞片后用乙酸双氧铀饱和溶液和柠檬酸铅双重染色,用本室的PHILIPS EM400透射电镜观察拍片。

结果:通过延长固定时间和渗透时间,样品得到较好的固定,切片连续成带。各种细胞器如质膜、叶绿体、线粒体、油滴、细胞壁等均得到较为理想的固定效果(图一1、2、3)。结果表明,样品并没有因为固定时间比常规方法规定的延长多倍而出现不良效应和磨像。

我们认为,类似于这一类表面具有毛状体,硅质晶体又较多的禾本科作物均可采用这一方法来制备电镜样品。

## 二、花生叶片的样品制备

花生是一种重要的农业经济作物,它的叶片表面具蜡被、叶背具绒毛,常规的方法不易固定。这一样品采用Hirsch & Fedorko (1968)氏戊二醛—四氧化钨( $O_3O_4$ )混合液一次双固定法固定。这一方法有报导认为对保存植物组织中多聚核糖核旦白体结效果特别好,对含有多糖的结构和膜以及其它含酯结构染色清晰。从某种意义上说,构这种混合一次双固定比相继的双固定效果更好。

本试验中用0.2M的二甲砷酸钠作缓冲液,固定时间约1小时。戊二醛和四氧化钨一旦混合将起强烈反应,因此,此固定液必须随备随用。固定时间视样品变黑程度而定,一般不超过1小时。固定后,组织用0.2M的二甲砷酸钠缓冲液洗涤干净。逐级渐进的乙醇(或丙酮)脱水。70%的脱水剂脱水前的各个步骤严格在0~4°C的低温条件下进行。每级脱水15~20分钟。环氧丙烷二次过渡,渗透方法与上述水稻叶片同。环氧树脂812\*包埋。其余步骤同上述水稻叶片。

从拍出来的电镜照片分析,各种细胞器的亚显微结构如细胞壁、叶绿体基质片层和基粒片层、嗜钨颗粒、淀粉粒都得到较好的固定效果(附图一4、5)。

戊二醛—四氧化钨( $O_3O_4$ )混合固定液一次双固定方法,时间短,操作并不复杂,对植物组织中各亚显微结构的固定效果较好,并具有一定的优越性,值得注重和推广应用。但作缓冲液的二甲砷酸钠溶液中的砷元素含有较高的毒性,所以在应用过程中,必须小心加以防护。至于能否用其它缓冲液代替,还须作进一步的研究。

## 三、花药的样品制备

花药是植物学工作者研究的重要对象之一。由于花粉粒的外壁主要是以花粉素和近于角质与纤维素的物质组成,是植物细胞中一种典型的细胞壁,坚硬而且透性极差,常规的电镜样品制备方法难于制备好这种细胞。针对它的细胞学特征,我们的做法是(以荔枝花药为例)将花药沿药隔部分切开(这一步骤应使整个花药浸在戊二醛固定液中进行),使之一分为二,并在花粉囊的一端切一小口,以利于固定液渗透进去。固定时间和方法与水稻叶片基本相同。

从以这种方法制备的荔枝花药样品的效果看,无论是退化层细胞或是毡绒层细胞,

特别是由小孢子壁紧紧包裹住的小孢子中的各种细胞器都得到较好的固定(附图—6、7)。

常规的生物样品固定时间规定,戊二醛一般为1~4小时,四氧化锇要求更严格,不得超过2小时,否则将使样品变脆,难于切片,甚至将破坏样品的亚显微结构。但本试验证明,由于植物细胞具有与其它生物样品所不同的细胞学特征,它的生物学特征也远较其它生物复杂,因此,必须针对不同植物的生物学特征和细胞学特征,在制备样品前,认真制订制备方案,选择好适当的固定液和固定方法。通常,适当地延长固定时间和渗透时间是大大有利于制备植物材料的电镜样品,而决不是相反。

#### 图版说明

1. 水稻(矮仔占)叶肉细胞,示细胞壁(CW)、质膜(Pm)、叶绿体(Ch)、线粒体(M)、胞间连丝(Pl)。×6,171
2. 水稻(广陆矮)叶肉细胞,示细胞核(N)、核仁(Nu)、叶绿体(Ch)、液泡(V) 11,000
3. 水稻(矮脚南特)叶肉细胞,示线粒体(M)、微体(Mb)、油滴(S)。×21,810
4. 花生叶肉细胞,示叶绿体(Ch)、嗜锇小体(Osb)、细胞壁(CW)、淀粉粒(Sg)。×24,861
5. 花生叶肉细胞,示叶绿体中的基粒片层(gl)、基质片层(Sl)、细胞壁(CW)。×75,860
6. 荔枝花药小孢子,示小孢子壁(MC)、萌发孔(A)、液泡(V)。×2,828
7. 荔枝花药小孢子,示小孢子壁(MC)、核(N)、核仁(Na)、液泡(V)。×11,000

图版

