

肉苁蓉种子和胚的整体透明染色技术研究

陈庆亮, 翟志席, 杨重军, 王华磊, 周海鹰, 郭玉海*

(中国农业大学农学与生物技术学院 中药材研究中心, 北京 100094)

目前, 研究寄生植物肉苁蓉种子萌发对环境刺激反应, 需要一项观察胚发育的简便技术, 以观察肉苁蓉种子萌发过程中胚的形态变化和对不同刺激(如神州4号人造卫星搭载、植物生长物质等)的反应。整体透明与染色技术, 已经成为研究受精前与受精后的向日葵、烟草胚珠生长发育的一项有效技术^[1], 也在拟南芥受精后胚的发育^[2]、水稻受精后胚的发育等研究成功应用^[3], 但在肉苁蓉种子的透明效果不明显, 因而有必要探索肉苁蓉种胚整体透明与染色技术及细节。本试验从固定、抽气、染色时间、水合时间、脱水时间、去种皮等环节研究了各因素对种胚透明、染色效果的影响, 建立一套适用于肉苁蓉胚的整体透明与染色技术, 并用于观察肉苁蓉种子对层积处理的萌发反应。

1 材料、仪器和试剂

1.1 植物材料: 肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 种子, 来自内蒙古自治区阿拉善盟吉兰泰肉苁蓉基地, 2004年5月末采收。种子直径 ≥ 0.7 mm, 含水量 5.15%, 千粒质量 0.086 5 g。

种子处理: 肉苁蓉种子在温度为 20 ℃ 的蒸馏水中浸泡 24 h; 5 ℃ 湿沙中层积 30、60、90 d。

1.2 仪器: Olympus BH-2 显微镜 (Olympus 公司); Olympus SZH10 体视显微镜 (Olympus 公司); SHB-Ⅱ 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司)。

1.3 试剂和配制: 无水乙醇、钾矾、甘油、甲醇、冰醋酸 (分析纯); 冬青油 (分析纯, 军事科学院药材供应站); 苏木精 (Fluka 进口分装, 上海化学试剂厂)

爱氏苏木精 (Ehrlich's hematoxylin) 原液的配制^[4]: 苏木精 1 g, 冰醋酸 5 mL, 甘油 50 mL, 纯酒精 50 mL, 钾矾 (potassiumalum) (2%) 50 mL。将苏木精、钾矾分别溶解在纯酒精和蒸馏水中, 然后将甘油加入苏木精酒精液中, 再与钾矾和醋酸混合。将此染色液放置暗处, 直到变为深红色时, 备用。

2 方法和结果

2.1 透明与染色试验处理: 种子处理: 去种皮、不去种皮。抽气处理: 不抽气、抽气。染色处理时间: 24、36、48 h。水合和脱水处理时间: 15、30、60、90 min。透明和染色效果作为试验指标。

2.2 肉苁蓉种子透明和胚染色的影响因素

2.2.1 种皮对种子透明和胚染色的影响: 肉苁蓉种子的种皮胶质影响物质的渗入, 种孔 (直径 200 μ m) 是液体进入的唯一快速通道。固定前不去除种皮, 因种皮阻隔而导致固定液向种子的渗透缓慢, 仅有部分胚清楚, 染色效果也较差 (图 1-A); 去除种皮处理, 解除了种皮的影响, 固定液可直接进入种子, 速度大为加快, 种子和胚透明清晰, 染色深度适宜, 胚和胚乳清晰可见 (图 1-B)。

2.2.2 抽气对胚乳透明和胚染色的影响: 种子内部存在空气, 是影响固定液、染色液在种子内均匀分布的一个因素。抽气是排除种子内部空气的手段。样品固定时不抽气, 固定液渗入慢、不均匀, 透明和染色效果差 (图 1-C); 样品固定时抽气, 种子透明和染色效果好, 胚及其形状清晰, 容易区分胚和胚乳 (图 1-D)。

2.2.3 染色时间对胚染色的影响: 染色时间对胚染色影响明显。染色时间少于 24 h, 则染色不足 (图 1-E), 染色时间在 24~48 h, 则染色层次分明 (图 1-F)。

2.2.4 水合和脱水时间对种子透明和胚染色的影响: 水合和脱水时间低于 60 min, 透明效果不佳 (图 1-G); 水合和脱水时间在 60 min 左右, 则透明层次分明、染色效果显著 (图 1-H), 90、60 min 效果几乎一样。

2.3 肉苁蓉种子整体透明与染色技术

2.3.1 抽气与固定: 去掉种子种皮, 立即放入醋酸-甲醇 (1:3) 固定液中, 在 0.09 MPa 左右大气压中抽气 5~10 min, 放置 24~48 h。

2.3.2 水合: 材料在 50% 酒精、25% 酒精、蒸馏水

收稿日期: 2004-12-10

基金项目: 河北省科技攻关项目 (03276408D-4); 重大基础研究前期研究专项 (2004CCA01200)

作者简介: 陈庆亮 (1972-), 男, 硕士生, 研究方向为肉苁蓉栽培生理学, 发表论文 8 篇。 E-mail: cqlcau@126.com

* 通讯作者 郭玉海 Tel: (010) 62732556 E-mail: yhguo@cau.edu.cn

中各放置 1 h, 最后再放入蒸馏水中过夜。

2.3.3 染色: 材料在爱氏苏木精原液(需充分氧化成熟): 45% 醋酸和 50% 乙醇等体积混合液(1: 2) 放置 24~48 h。

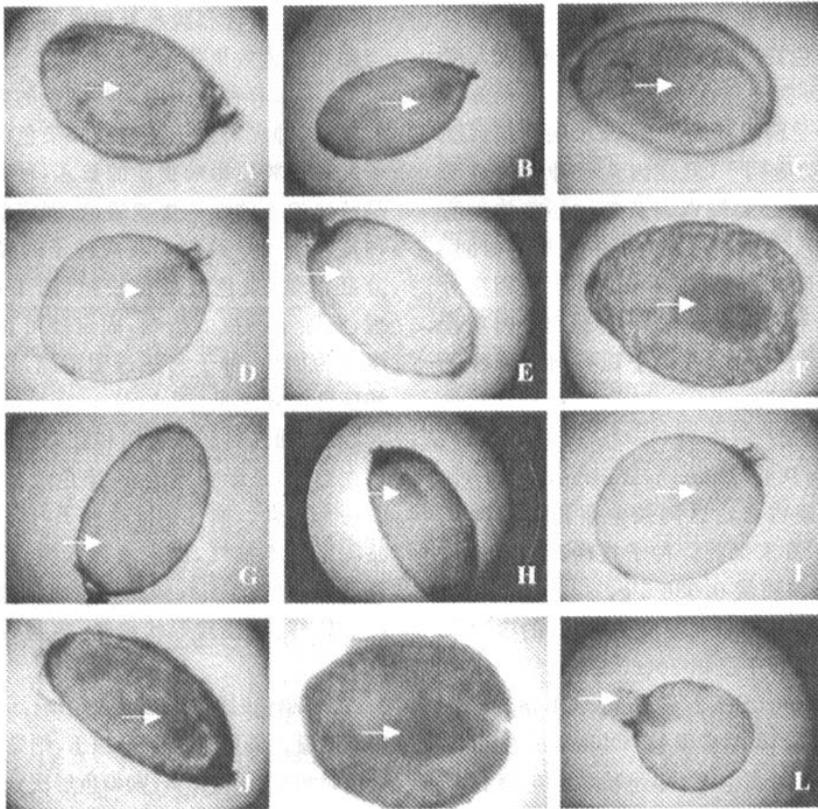
2.3.4 换洗: 材料先用蒸馏水在 24~48 h 内换 4~5 次; 再用自来水在 24~48 h 内换 3~4 次。

2.3.5 脱水: 材料在 25%、50%、70%、95%、100% 酒精中各放置 1 h, 最后再放入 100% 酒精中过夜。

2.3.6 透明: 材料放入酒精-冬青油(1: 1) 1 h, 再

放入冬青油中 3 次, 每次 1 h, 然后再放入冬青油中过夜, 最后在 Olympus BH-2 显微镜下观察、拍照。

2.4 用肉苁蓉整体透明与染色技术观察肉苁蓉种胚形态变化: 利用肉苁蓉种子透明与染色技术观察, 层积后肉苁蓉种胚的形态发生显著变化。成熟种子的胚为球形(图 1-I)这与前人观察结果一致^[5]。层积后 30 d 胚的顶芽极突起(图 1-J); 层积后 60 d, 胚的胚根极伸长, 从原来包围着胚的胚乳处伸出(图 1-K); 层积后 90 d, 种子萌发(图 1-L)。



A-固定前没去种皮 B-固定前去除种皮 C-固定时没有抽气 D-固定时抽气 E-染色时间少于 24 h F-染色时间 24~48 h G-水合和脱水时间少于 60 min H-水合和脱水 60 min 左右 I-球形胚 J-胚芽极和胚根极伸长 K-胚根极即将伸出胚乳 L-胚根极伸出胚乳。→胚
 A-with seed coat before fixing B-without seed coat before fixing C-fixing without aspirating
 D-fixing with aspirating E-staining time less than 24 h F-staining time 24-48 h G-hydration and dehydration time less than 60 min H-hydration and dehydration time about 60 min I-globular embryo J-embryo bud and embryonic root polar elongating K-embryonic root polar protruding from endosperm L-embryonic root polar protruded from endosperm. →embryo

图 1 荒漠肉苁蓉胚和胚乳的染色和透明及其种子的萌发

Fig. 1 Staining and clearing of embryo and endosperm and seed germination in *C. deserticola*

3 讨论

3.1 自 20 世纪 70 年代 Herr 发明胚珠的整体透明技术以来, 透明技术被不断改进。最初, 用于观察茄科茄属植物的大孢子母细胞、大孢子和胚囊^[6,7]。经

Grane 改进^[8], 可用于观察胚珠、子房, 但存在透明后胚珠、子房内部反差小的问题。Stelly(1984)、杨弘远(1986)用先染色后透明的方法^[1,9], 反差明显。但用于肉苁蓉种子的透明效果不明显。本实验结果表

明,种皮、抽气、染色时间、脱水时间和水合时间,对透明效果有明显影响。去掉种皮、固定时抽气、染色时间及脱水时间和水合时间加长取得良好的透明效果,并建立了一套肉苁蓉种子整体透明与染色技术,用于肉苁蓉种子胚的形态观察。这项技术为观察肉苁蓉种子萌发过程中胚的形态变化和对不同刺激(如神州 4 号人造卫星搭载、植物生长物质等)的反应提供了一种新的手段。

3.2 寄生植物肉苁蓉的种子萌发机制是肉苁蓉栽培学的重要问题。最近报道,肉苁蓉种子在 1/2MS 培养基上有萌发现象^[10]。本实验结果表明,5℃湿沙层条件下肉苁蓉的种子可萌发,但萌发率很低。关于肉苁蓉种子萌发的机制和萌发条件,仍是需要进一步研究的课题。

References:

[1] Yang H Y. The use of whole stain-clearing technique for observations on embryo sac, embryo, endosperm and embryonic [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1986, 28(6): 575-581.
 [2] Wu X D, Yang S J. The use of whole clearing technique for

observation of *Arabidopsis thaliana* embryonic development [J]. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 1997, 5(1): 95-97.

[3] Chen J S, Zhao S X. A study on cell embryology of rice 84-15 [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 1999, 16(3): 284-287.
 [4] Li Z L. *Technology of Plant Flaking* (植物制片技术) [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1987.
 [5] Li T R, Ge J X, Xu Y Y. The seed germination of *Cistanche deserticola* Y. C. Ma and its relationship with host plant *Haloxylon ammodendron* Bunge [J]. *J Inner Mongolia Univ* (内蒙古大学学报), 1989, 20(3): 395-400.
 [6] Herr J M. A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms [J]. *Am J Bot*, 1971, 58: 785-790.
 [7] Herr J M. An analysis of methods for permanently mounting ovules cleared in four-and-a-half type clearing fluids [J]. *Stain Technol*, 1982, 57: 161-169.
 [8] Grane C F. Apomixis and crossing incompatibilities in some Zephyranthaceae [A]. *Dissertation of Doctoral Degree of University of Texas* [D]. Austin TX: University of Texas, 1978.
 [9] Stelly D M, Peloquin S, Palmer R G, et al. Mayer's hemalum-methyl salicylate, A stain-clearing technique for observation within whole ovules [J]. *Stain Technol*, 1984, 59: 155-166.
 [10] Sheng J H, Zhai Z X, Guo Y H. Morphology of seed germination and haustorium formation in *Cistanche deserticola* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(9): 1047-1049.

广东菲牛蛭生活水体的化学环境

谭恩光

(中山大学中山医学院 生物学教研室, 广东 广州 510089)

蛭类俗称蚂蟥,是传统中药。《本草纲目》对水蛭的药理、疗效、使用方法作了较全面记载。现代药理实验表明水蛭注射液能使肿瘤细胞坏死、消失,对网状内皮细胞有增强作用。与非吸血蛭类比较,吸血的非牛蛭唾液腺含有较丰富的抗血液凝固水蛭素,在医药学上有重要价值。有关吸血蛭类繁殖饲养研究,国内谭恩光(2002)曾报道广东菲牛蛭 *Hirudinaria manillensis* Lesson 的生长和生殖,及吸血山蛭的生态分布、生长、摄食和生殖^[1~3]。国外 Keegan(1968)对东南亚的非牛蛭生活习惯进行观察^[4]。1992 年 Steiner 从产自马尼拉的非牛蛭中分离纯化新的水蛭素,测定其原始结构和功能表明有抗凝活性^[5]。1993 年 Scacheri 从非牛蛭中分离出 2 种水蛭素变异体,测定其氨基酸序列,cDNA 克隆和表达,表达产物有抗凝活性^[6]。2002 年谭恩光等从广东产的非牛蛭基因组中 PCR 扩增出水蛭素基因,并克隆和侧

序,表明与马尼拉的非牛蛭水蛭素基因 Hm₁ 和 Hm₂ 同源性分别为 90% 和 88.6%,说明国产非牛蛭有抗凝作用^[7]。有关蛭类田间饲养主要是非吸血的金线蛭,如宽体金线蛭。现报道广东菲牛蛭生活水体的化学环境,为田间规范化人工饲养牛蛭提供基础资料。

1 材料与与方法

1.1 水样的采集,在广州市郊的水稻田、菜田的沟渠,低洼处等有牛蛭活动的水体,分别采集水样,后混合在一起,带回实验室分析。结合室内人工饲养牛蛭的水体,从幼体开始饲养,每月采水样 1 次,检测其化学成分 1 次,每月换水 1 次。检测水样重复 3 年。

1.2 水样化学分析方法,水样采回后,分析 K⁺、Na⁺、Fe³⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Cl⁻、HCO₃⁻、PO₄³⁻、SO₄²⁻ 和 pH 值共 10 项。其测定方法:PO₄³⁻ 磷钼兰比色法;Cl⁻ 硝酸银滴定法;SO₄²⁻ 铬酸钼比色法;HCO₃⁻ 酸碱滴定法;pH 用 pH 测定仪;Ca²⁺、Mg²⁺、Fe³⁺、

收稿日期:2005-01-28

基金项目:国家自然科学基金资助项目(3880086、39160017);广东省医学基金资助(1996);广东省中医药基金资助(200011)。

作者简介:谭恩光,男,广东阳江人,教授,研究方向为蛭类及在医学上应用。E-mail:tanenguang@21cn.com