

技术与方法

利用蜡叶标本进行子囊超薄切片的方法

姜玉梅 谢家仪

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 利用蜡叶标本为材料, 对地衣型子囊菌石耳科子囊进行超薄切片实验。由于对蜡叶标本的充分活化与包埋是该方法的关键, 因此, 在活化剂和包埋剂等方面进行了选择和调整, 从而使超薄切片获得了良好的效果。

关键词 蜡叶标本; 子囊; 活化剂; 包埋剂; 超薄切片

子囊顶部的微观和超微结构在现代子囊菌(地衣型与非地衣型)系统分类与演化中具有重要意义。利用新鲜材料进行超薄切片需要及时野外采集或通过人工培养以得到子囊阶段的材料。但是, 人工培养不能使所有要研究的对象都能获得子囊阶段材料, 而且有些类群如专性寄生子囊菌, 难以进行人工培养; 有些类群如地衣型子囊菌虽能实行人工培养, 但生长缓慢, 难以出现子囊阶段; 而进行及时的野外采集又受到季节的限制, 不能根据室内研究的需要及时取样。因此, 利用蜡叶标本进行子囊超薄切片就可避免以上的困难。

由于我们所使用的超薄切片材料是多年保存在标本室的蜡叶标本, 因此, 在材料的预处理(如活化与包埋)方面比使用新鲜材料更为复杂, 活化剂和包埋剂的选择就显得十分重要。

我们在参考了植物材料的超薄切片技术^[1]和采自野外新鲜地衣材料的超薄切片方法^[2]的基础上, 经过多次实验, 总结出适用于地衣型子囊菌石耳科蜡叶标本的子囊超薄切片方法, 现介绍如下。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 供试的蜡叶标本: 疱脐衣 [*Lasallia pustulata* (L.) Merat], 魏江春等于 1982 年采自瑞典斯德哥尔摩郊区 (HMAS-L); 露西庖

脐衣 [*L. rossica* Domb.], V.M.Burkova 于 1965 年采自俄罗斯布里亚特 (LE); 魏江春等于 1983 年采自吉林长白山, No.6251(HMAS-L); 中华疱脐衣鳞芽变种 [*L. mayebarae* (Sato) Asahina var. *sinensis* (Wei) Wei], 魏江春于 1964 年采自中国云南丽江 No.2590(HMAS-L); 淡肤根石耳茶渍果变种 [*Umbilicaria virginis* Schaer. var. *lecanocarpoides* (Nyl.) Wei & Jiang], H. Smith 于 1934 年采自中国四川康定, No.14006(UPS); 淡肤根石耳原变种 [*U. virginis* var. *virginis*], 王先业于 1977 年采自中国新疆天山, No.946(HMAS-L); 多盘石耳 [*U. proboscidea* (L.) Schrad.], 产于日本, (UPS.TUR); 放射盘石耳 [*U. muehlenbergii* (Ach.) Tuck.], 魏江春于 1977 年采自中国大兴安岭 (HMAS-L); 云南石耳 [*U. yunnana* (Nyl.) Hue], R.P.Delavay 于 1885 年采自中国云南大坪子 No.1600 (H-Nyl. 31740 Holotype)。

2. 试剂: 50% 乙醇, 无菌蒸馏水, 3% 戊二醛, 1% 高锰酸钾, Spurr 树脂, 2% 醋酸双氧铀-柠檬酸铅, 磷酸缓冲液 (pH 7.1)。

(二) 方法

1. 活化: 将从地衣体上切下的子囊盘置于 50% 乙醇中浸泡 30 分钟, 再用无菌蒸馏水浸

泡,每隔30分钟换一次水,共换3次。

2. 固定:将活化材料置于3%戊二醛中固定45分钟,抽真空;换新鲜戊二醛固定4小时;用磷酸缓冲液(pH 7.1)冲洗3次,置1%高锰酸钾中固定45分钟;再用磷酸缓冲液冲洗3次。

3 脱水:将固定的材料分别用30%、50%、70%的乙醇进行脱水各30分钟;再于85%、95%乙醇中脱水各1小时,转入无水乙醇中浸泡2小时,再换一次无水乙醇于冰箱中过夜。

4 包埋:对经冰箱过夜的材料每隔20分钟加入10滴Spurr包埋剂并使之混匀,直至乙醇:包埋剂浓度达10:90;换入Spurr包埋剂浸泡8小时;再换Spurr包埋剂浸泡过夜。

将已浸透的材料包埋入Spurr树脂中,加温至30℃聚合12小时,然后升温至45℃聚合12小时。

置包埋块于LKB III型超薄切片机上切片,用醋酸双氧铀-柠檬酸铅对切片进行双重染色;将染色的切片置日立H-600型透射电镜下观察。

结 果 与 讨 论

使用保存多年的地衣蜡叶标本进行子囊超薄切片与使用新鲜地衣材料的区别在于首先要对蜡叶标本进行活化。而石耳科地衣的子囊盘盘壁(果壳)多为紧密坚硬而碳化了的组织,因此给样品的活化和包埋带来很大困难。

我们曾采用无菌蒸馏水为活化剂,Epon812树脂为包埋剂,获得的切片脆而易碎,无法使用。造成失败的原因可能是由于石耳科子囊盘的蜡叶标本样品活化时出现憎水现象,因而活化与包埋受阻。基于以上的分析,根据湿润的原理^[3],我们换用表面张力比水小的乙醇为活化剂^[3],因而使石耳科地衣蜡叶标本的子囊盘易于湿润,组织内部也呈现生活状态;同时采用抽气固定^[1]的方法,以便充分排除组织内部的气体;再换用粘度较低的Spurr树脂为包埋剂,使包埋得以充分进行。我们曾进行了4次实验共10个样品,结果超薄切片全部成功,效果良好(图1,2)。

本方法特点是采用保存在标本室的蜡叶标本为材料,根据研究工作的需要,可随时取材,为研究工作提供了很大方便。另外,在后固定

中,以高锰酸钾代替四氧化钨,可获得良好的实验结果,既节约经费,又可避免对人体的毒害。

此法虽以地衣型子囊菌石耳科子囊盘的蜡叶标本为材料,也可作为其它地衣型与非地衣型子囊菌的蜡叶标本进行超薄切片之参考。

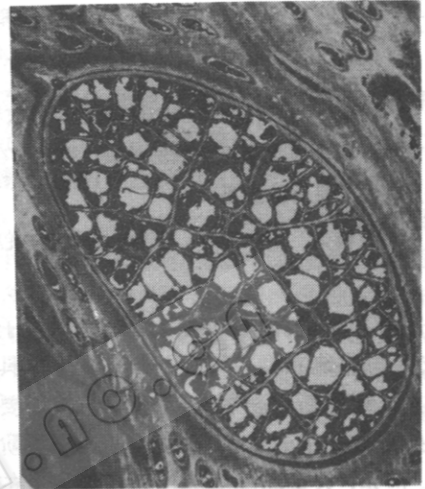


图1 露西胞脐衣 (*Lasallia rossica*) 的子囊和孢子



图2 露西胞脐衣 (*L. rossica*) 的子囊顶部结构

参 考 文 献

1. 徐是雄:植物材料的薄片、超薄切片技术,北京大学出版社,1981年。
2. Honegger R: The Lichenologist, 10:49, 1978。
3. H. П. 塔斯可夫等著:胶体化学教程,商务印书馆,1954年。

(1993-5-27 收稿)