

文章编号: 1000-7423(2006)-Suppl-0065-04

【实验技术】

植物寄生线虫标本制作方法简介

段玉玺, 陈立杰

【提要】 本文介绍植物寄生线虫的标本制作方法。重点介绍临时玻片标本和永久玻片标本的制作, 简要介绍植物寄生线虫的染色方法。这些方法对植物寄生线虫的分类鉴定和侵染特性研究具有重要意义。

【关键词】 植物; 寄生线虫; 标本制作方法

中图分类号: S432.4

文献标识码: A

Processing Methods of Plant Nematode Slides

DUAN Yu-xi, CHEN Li-jie

(Plant Nematology Laboratory, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

【Abstract】 The processing methods of plant nematode slides were introduced in this paper, including temporary mounts, permanent mounts and the stain method for nematode. Each method was described step by step in detail. These methods were essential to the study on classification, identification and characteristics of the plant nematode.

【Key words】 Plant; Nematodes; Slide processing

Supported by the Natural Resource Platform Project from Ministry of Science and Technology (No.2005DKA21104)

植物寄生线虫标本制作方法因工作性质、研究目的和要求的不同而不同。在调查虫口密度及观察一般形态结构时, 常采用临时制片法制作标本。需要进一步观察或进行分类鉴定, 则需要经过脱水制成永久玻片标本并长期保存。石蜡切片常用来观察线虫在植物体内的寄生和危害情况, 以及植物组织发生的病理改变等^[1]。

1 临时玻片标本的制片方法

临时玻片标本的制作方法简单快速, 不需要特殊的仪器设备及药剂, 有利于快速鉴定线虫的种类。

在制作临时玻片标本时, 目前常用的浮载剂是水、3%甲醛或其他合适的固定剂如三乙醇胺-甲醛固定液 (TAF)、甲醛-冰醋酸固定液 (FA)、甲醛-冰醋酸-乙醇固定液 (FAA) 等均可。所用支撑物是 5 mm 长的细玻璃纤维, 最理想的支撑物直径应与所观察的线虫直径相近, 以防止盖玻片压扁虫体。常用封片剂有亚麻子油-火棉胶等封片剂 (Glyceel, 英国商品名)、指甲油、中性树胶、阿拉伯树胶或快干搪瓷等。也有用石蜡凡士林混合剂, 该封片剂最早由 Doncaster 使用, 配方为 8 份石蜡与 3 份凡士林, 65 °C 下充分混匀后即可使用。石蜡凡士林混合剂具有固化速

度快的优点。从带光源的双目体视显微镜下挑取线虫需要用挑针, 挑针通常有毛针, 可用竹签、细的尼龙丝等制成, 也有现成的金属针^[2]。

竹签针的制作方法: 截一段长 15 cm、宽 2~3 cm 的竹片, 一端用刀削成细的尖头, 然后把这尖头在体视显微镜低倍镜下用刀细心削尖, 直至末端尖头仅有几根纤维。

毛针的制作方法: 织毛衣的竹针一端, 在解剖镜下小心再削尖、削细, 取眉毛一根, 竹针尖端沾少许 Zut (亚麻子油-火棉胶等封片剂, 美国商品名) 封固剂, 将眉毛根部粘在竹针上, 眉毛的末端部露出, 干燥后即成。

1.1 已经杀死与固定的线虫临时玻片标本的制作

A. 用吸管汲取一滴浮载剂滴于洁净载玻片标本中央。液滴要小, 使加盖玻片后浮载剂恰好铺满盖玻片所占的空间, 而不溢出太多;

B. 将固定好的线虫移入浅培养皿中, 而后移至体视显微镜下, 用挑针将数条线虫 (一般为 5~10 条) 逐条挑至载玻片中央的浮载剂中;

C. 将载玻片置于体视显微镜下观察, 用挑针小心排匀沉于浮载剂底部的线虫;

D. 选取与线虫虫体直径相似的 3 根 3~5 mm 左右的支撑物, 均匀置于浮载剂边缘;

E. 细心将烤热的盖玻片盖于浮载剂上, 应避免产生气泡;

基金项目: 科技部自然资源平台项目 (No.2005DKA21104)

作者单位: 沈阳农业大学植物保护学院植物线虫学研究室, 沈阳 110161

F. 在体视显微镜下用裁成小条的滤纸吸去多余的浮载剂。操作时应小心, 避免线虫的移动;

G. 用封片剂封片。待封片剂干后, 贴上标签, 即可用于形态观察。

1.2 活线虫临时玻片标本的制作

A. 用吸管吸取一小滴水至洁净载玻片中央;

B. 将盛有线虫的培养皿移至体视显微镜下, 用挑针挑取若干条线虫至水滴中;

若线虫游动过快, 可用麻醉剂麻醉或将玻片在小火焰的酒精灯上方轻烤 5 s 即可使线虫暂时停止游动。以后程序同上 C~G。

用已固定的线虫制成的临时玻片标本保存时间可从几天至数周。这与线虫种类、使用的固定剂及封片剂有关。若将制成的临时玻片标本置于铺好潮湿滤纸的培养皿内, 放置在冰箱内或低温处可保存较长时间, 并且虫体形态十分清晰。但对于用活线虫制成的临时玻片标本必须在数小时内使用, 最长不超过 24 h, 否则线虫虫体的变形将影响观察。

2 永久玻片标本的制片方法

永久玻片标本的制作手续较复杂, 但保存时间长, 是线虫标本的重要保存方式。

2.1 线虫的脱水 用乳酚油或丙三醇作浮载剂, 首先要将线虫脱水, 并在浮载剂中充分浸透。这些过程一定要仔细, 以免由于浸透作用而使线虫虫体扭曲变形。

固定好的线虫常由于肠内的颗粒使体内一些形态结构(特别是腺体)变得模糊不清。经过乳酚油处理或丙三醇脱水后, 线虫标本的一些特征又变得清晰可见。乳酚油脱水所需时间较短, 处理后的标本可保存数年; 但若置于光下, 标本将容易被破坏。Esser (1974) 报道保存于乳酚油中的线虫标本经 16 年后与保存于丙三醇中的标本一样完好。Hooper (1986) 报道在英国洛桑试验站用乳酚油保存的线虫虽有 30 多年的历史, 但是仍然完好无损。丙三醇脱水后, 线虫标本几乎可以在丙三醇中无限期保存, 且制成的玻片线虫标本光学质量比乳酚油脱水制成的线虫标本更佳。但丙三醇脱水所需时间较长。目前大多数线虫永久玻片标本均是用丙三醇脱水制成。

2.1.1 乳酚油快速脱水法 Franklin 与 Goodey (1949) 发现用乳酚油脱水, 可以得到优质的线虫标本。该方法虽然在操作中有一定的危险性, 但是, 只要谨慎使用, 可以保证虫体形态及消化系统完整与清晰。

乳酚油的配制与保存: 苯酚(液体) 500 ml, 乳酸 500 ml, 丙三醇 1 000 ml, 水 500 ml。

除纽带科(Hoplolaimidae)及环科(Criconematidae)

的一些线虫外, 通常在乳酚油中加入少量染料, 增强背衬, 以利观察。常用的染料为棉蓝或甲基蓝。配制时, 先将所需的染料溶于水中, 再将各组份均匀混和。染料的浓度为 0.002 5%~0.01%。配制好的乳酚油应保存于棕色瓶中, 并置避光处。

乳酚油脱水法操作步骤: ① 取一洁净凹玻片, 在凹穴内加满乳酚油; ② 将凹玻片置于加热板上, 加温至 65~70 °C; ③ 在体视显微镜下用挑针将已至少固定 1 d 以上的线虫移至热的乳酚油中; ④ 继续加热 2~3 min, 而后在体视显微镜下观察线虫标本是否清晰。若仍不清晰, 在 65~70 °C 下继续加热片刻直至清晰为止。

操作过程中, 应避免过度加热, 否则会损坏标本。经上述处理后的线虫即可直接用于制作永久玻片标本。Esser (1973) 对乳酚油作了改进, 使固定脱水时间缩短至 4 min。苯酚为强毒性化学试剂, 在配制及使用乳酚油时, 应避免苯酚溶液与皮肤接触, 以免引起损伤。

2.1.2 丙三醇脱水法 经丙三醇脱水制成的线虫标本清晰, 易长久保存, 至今已报道多种丙三醇脱水方法。Seinhorst (1959) 发明的丙三醇-乙醇脱水法能获得高质量的线虫标本, 耗时较少(需 1~1.5 d)。Baker (1953) 的快速丙三醇脱水法虽需时间极短(1h 左右), 但需要多次挑取线虫。目前, 常用的是丙三醇缓慢脱水法。该方法虽耗时数天至几周, 但获得的线虫标本质量最佳。Garber 等(1982) 认为, 脱水时间越长, 获得的标本质量越佳。而 Malcevski 及 Zulliui (1973) 认为, 在 20% 的丙三醇液中 50~60 °C 时加热已固定的线虫直至完全脱水也可以获得质量高的标本, 并且可以缩短脱水时间。

2.1.3 丙三醇-乙醇脱水法(Seihorst, 1959) 丙三醇-乙醇溶液的配制: Seihorst 发明的丙三醇-乙醇脱水液由两种脱水液组成: 脱水液 I (100 ml), 含 96% 乙醇 20 ml, 丙三醇 1 ml, 蒸馏水 79 ml; 脱水液 II (100 ml), 含 96% 乙醇 95 ml, 丙三醇 5 ml [3]。将配好的 2 种脱水液分贮于试剂瓶内。

丙三醇-乙醇脱水法操作步骤:

A. 取一洁净染色皿或一小培养皿, 加入脱水液 I 0.5~1 ml;

B. 用吸管吸取已固定的线虫至盛有脱水液 I 的染色皿中;

C. 在干燥器内注入 96% 的乙醇至器积的 1/10 左右; 再把染色皿置于干燥器内, 盖上干燥器盖;

D. 将上述干燥器放于 35~40 °C 温箱内, 保持 12 h 以上;

E. 打开干燥器盖, 吸去染色皿中部分液体, 再加入脱水液 II 至染色皿满为止;

F. 在 40℃ 下脱水 3 h 以上, 使乙醇慢慢蒸发, 直至线虫完全处于丙三醇液中。

Grisse (1969) 提出用 4:1 固定液替换脱水液 I, 可以减少乙醇对标本的影响。该固定剂 (100 ml) 配方为: 40% 甲醛液 8 ml, 丙三醇 2 ml, 蒸馏水 90 ml。

要获得高质量的线虫标本, 脱水过程所有使用的器皿、吸管及脱水液必须干净。

2.1.4 丙三醇缓慢脱水法 不同研究者所用的丙三醇缓慢脱水法略有不同。一般而言, 从脱水开始至线虫体内水份完全被纯丙三醇替代约需 4 周时间, 如果脱水过快会引起线虫虫体变形。从目前来看, 要获得好的线虫标本, 主要依靠经验。值得注意的是由于该方法耗时较长, 因此一般在脱水液中加入 1 滴饱和 CuSO_4 液或溴百里酚液体或其他试剂, 以免霉菌生长。一些研究者在 30~60℃ 的温箱内进行脱水, 但必须在盛有线虫的器皿上加盖, 以免蒸发过快引起线虫扭曲。

2.1.5 Golden 法 查阅文献, 大多数线虫学家采用 Golden 的方法。具体操作步骤如下:

A. 用吸管将已固定的线虫移至一洁净的染色皿内, 再在染色皿上加盖一空的染色皿(以免蒸发过快);

B. 将染色皿置于 40~50℃ 的温箱内, 保持数分钟;

C. 在染色皿内加入已预热的 4:1 的 FG 固定液, 用量一般占染色皿体积的 2/3;

D. 经 24 h 后, 滴加 2 滴饱和苦味酸 (苦味酸的作用是防止霉菌生长, 避免口针褪色或变形);

E. 视蒸发情况, 及时加入预热的 FG 固定液。通过不断的“蒸发-添加”, 线虫体内的水份逐渐为丙三醇取代, 以致获得完全脱水的线虫;

F. 待线虫完全脱水后, 加入数滴预热的纯甘油液。

上述 B~F 均在温箱内进行。操作过程中必须保证所有器材及试剂干净。完成该脱水过程一般需 5~6 周。脱水后的线虫即可用于制作永久玻片标本或在丙三醇液中长久保存。

现在大量材料制片采用更简单的作法: 在贝氏小皿中或小的玻璃器皿中放入 1.5%~2.0% 的丙三醇, 将已固定好的线虫标本转移入其中, 然后将小皿放入干燥器内, 缓慢干燥, 直至全部水分蒸发, 线虫体内被纯丙三醇浸透为止。

2.2 永久玻片标本的制作程序 Hooper (1986, 1987) 比较了保存于英国洛桑试验站各种来源的线虫

永久玻片标本, 发现许多标本由于制作过程中选用不适当的支撑物或封片不妥导致标本干瘪或压扁虫体。用蜡环支撑并仔细封片的永久玻片标本能保持很长时间。Maesener 等 (1963) 提出用蜡环不仅可以用作支撑物, 而且可部分地起到封片剂的作用。

2.2.1 永久玻片标本的制作程序

A. 将一干净的打孔器 (直径为 1.5 cm) 在酒精灯火焰上加热, 立即蘸取少量石蜡凡士林混合体 (配方见临时玻片标本制作部分), 并在一洁净载玻片中央轻按, 待冷却后载玻片上即有一蜡环;

B. 在蜡环内滴上一小滴纯丙三醇。注意, 纯丙三醇的用量宜少, 以加上盖玻片后不致外溢为宜。操作过程中应避免产生气泡。若用乳酚油脱水, 可以用乳酚油液作浮载剂;

C. 在体视显微镜下用挑针将已完全脱水的线虫移至载玻片上纯丙三醇滴的中央, 用针排匀线虫并将其沉底。

D. 用挑针蘸 3 根与线虫粗细相似的玻璃纤维小段, 呈三角形排列在线虫的边缘;

E. 取一洁净的盖玻片, 置于加热板 (65℃) 上数分钟或在酒精灯小火焰上轻烤数秒后盖于纯丙三醇滴上方, 注意避免产生气泡及线虫的移动;

F. 将此载玻片移至加热板加热 (65~70℃), 随着石蜡凡士林混合剂的融化, 用挑针或玻棒轻压盖玻片使蜡环与盖玻片紧密接触;

G. 将载玻片移至实验台上冷却, 再用封片剂封片, 封片剂分两次使用。当前一次封片剂封片完全干燥后, 再用封片剂加封一次。最后用体视显微镜检查封固是否完善。注意: 适用于永久玻片标本的封片剂为中性树胶、阿拉伯树胶及 Zut (Glyceel) 等;

H. 待封片剂干燥后, 贴上标签。标签内容要规范。

在线虫的永久玻片标本制作中, 有时用薄的铝片 (12~13 号, 厚度为 0.3 mm) 代替载玻片, 铝片大小为 (80×33) mm, 中央有一直径为 22 mm 的圆孔, 两侧卷边 3.5 mm。载玻片实际宽度为 26 mm。将 (25×25) mm 的方形盖玻片插在铝片中央, 上面加浮载剂和线虫, 然后再加直径为 20 mm 的圆形盖玻片, 封固。盖玻片两侧用前缘略呈倾斜的硬纸板压住, 硬纸板则用铝片两侧的卷边压紧。在硬纸板上贴上标签。铝片载玻片的优点是可以从正反面观察线虫特征。玻片标本可以叠在一起而不致磨损, 跌落在地上也不会破碎^[2]。

3 植物线虫的染色

植物线虫的鉴定主要依靠线虫的形态特征, 但由

青海省反刍家畜寄生线虫的分类整理

蔡进忠

【摘要】 本文对 1952–2005 年青海省各级兽医科研、教学和技术推广单位收集的动物寄生虫标本进行了系统整理,按 Yamaguti 的分类系统,对青海省反刍家畜的寄生虫进行分类,归纳青海省反刍家畜寄生线虫的各类虫种,隶属于线形动物门线形纲的 6 目 15 科 24 属,其中线虫 85 种,包括肺线虫 13 种,消化道线虫 71 种,幼虫寄生于横纹肌的线虫 1 种。

【关键词】 青海省;牦牛;藏系绵羊;线虫;分类

中图分类号: S852.7

文献标识码: A

Classification of Nematode in Ruminant from Qinghai Province

CAI Jin-zhong

(*Qinghai Academy of Animal and Veterinary Sciences, Xining 810016, China*)

【Abstract】 To classify and identified the nematode parasized in ruminant in Qinghai province, the mature nematode specimen parasized in Tibetan sheep, goat, yak, ox and camel was collected and classified systematically, by adopting classification systems of Yamaguti (1961). All those specimens belong to 24 genera of 15 families of 6 orders in nematode of Nematelminthes Class, of which 85 kinds of nematodes were sorted out, among them 13 lung nematodes, 71 digestive nematode and 1 muscle nematode were classified.

【Key words】 Qinghai Province; Yak; Tibetiansheep; Nematode; Classification

作者单位:青海省畜牧兽医科学院,青海 810016

于线虫虫体透明,一些内部结构较难观察清楚,因此常需要对线虫进行染色,增强反差,更好地区分线虫的内部细微结构。如固定的线虫经过多色蓝染色后,线虫的肠呈绿色,生殖器官与卵原细胞或精原细胞呈蓝紫色,细胞核为浅红色,染色体为蓝紫色,其他器官如神经环、神经细胞等呈深蓝或深紫色,性器官及阴门周围的特征也能清晰地显示。另外,染色对有些工作是十分必需的,如观察植物体内的线虫,有时不易看清楚,将植物组织与线虫染成不同的颜色,就很容易区别。研究过程中应依据线虫的不同生存状态选择不同的染色方法。

线虫的死体染色多采用多色蓝、醋酸地衣红与丙酸地衣红、甲苯胺蓝或尼罗蓝 B、氯化金(AuCl₃)等染色方法。线虫的活体染色通常采用硝酸银染色法(主要用于观察线虫的外周神经系统、下皮层组织及表皮组织特征)、苏木精地衣红染色等方法。植物组

织内线虫的染色,常用次氯酸钠-酸性品红染色法,或者乳酚油-棉蓝液或乳酚油-酸性品红染色,乙醇-酸性品红染色法和弗来明染色法也比较常用。具体的染色方法参见刘维志教授主编的《植物线虫研究技术》一书^[1]。

参 考 文 献

- [1] Liu WZ. Technology and methods for Plant Nematodes[M]. Shenyang: Publishing Company of Liaoning Science and Technology, 1995. 1-242. (in Chinese)
(刘维志,等. 植物线虫学研究技术[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1995. 1-242.)
- [2] Barker KR, Carter CC, Sasser JN. An advanced treatise on Meloidogyne[J]. Methodology[M]. North Carolina State University, USA, 1985. 1-223.
- [3] Southey JF. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes[M]. 5th ed. London: Ministry of Agriculture, Fisheries & Food, Her Majesty's Stationery Office, 1970. 1-148.

(收稿日期:2006-11-10 编辑:富秀兰)