

パラフィン包埋切片による植物種子標本作製の条件検討

○桑原隼也, 杉原弘貢

鳥取大学技術部 化学バイオ・生命部門 組織解析分野

1. はじめに

組織解析分野は、通常業務としてヒトや実験動物の生体試料のパラフィン包埋切片による光学顕微鏡標本を作製している。

本学農学部所属研究者より、この技術を用いた植物種子の標本作製の可否について相談を受けた。調査の結果、種子の標本作製例は見受けられなかったため予備実験として、種子標本作製の可否の検証と観察に堪える標本作製のための条件検討を行った。

2. 方法

研究者より提供された果実のメロン大（受粉後 25 日，約 9cm），メロン中（同 20 日，約 7cm），メロン小（同 10 日，約 4.5cm），キュウリ（同 5 日，約 7.5cm）から、図 1 に示す生体試料標本作製プロトコールに沿って種子標本を作製した。

この際に「種子に割は必要か」「固定による防腐処理は種子組織に必要か」「乾燥種子の使用は可能か」「植物試料で最適な厚さは何 μm か」の 4 項目を検討した。

新鮮な種子を図 2 に示す通りに割，固定，乾燥の処理を行い，各試料の T1～T4 とした。メロン小とキュウリは種子のみでの標本化が難しい大きさだったため，果肉組織ごと処理を行い T2 にあたるものは作らなかった。

T3 の固定は 10%ホルマリンを用い，T4 は冷蔵保存による乾燥をそれぞれ 4 日間行った。4 日の間に T1 と T2 は薄切まで工程を進めたが，割の無い T2 は種子の殻の硬さにより標本化に堪える切片ができなかった。そのため T3，T4 は処理後の試料から割有のものを選り，パラフィン浸透および包埋を行った。

5 μm ，10 μm ，20 μm で薄切しヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

3. 結果

使用した果実では育成段階や種類に関わらず，生体試料標本作製プロトコールおよび染色法の変更なく適応できた。各検討項目の結果は次の通りであった。

割の有無について図 3 と図 4 を比較すると，メロン中 T2 は種子形態の維持ができなかった。メロン大の種子も同様の結果となった。

固定の有無と乾燥種子の使用について，図 5 と図 7 でメロン大の種子組織に欠損が見られた（点線で囲った部位）。図 6 は目立つ欠損はなかったが，内部に空胞が見られた（矢印で示す部位）。メロン中でも同様の様子が見られ，果肉組織を含むメロン小（図 8，図 9，図 10）やキュウリでも同様の結果となった。

切片の厚さは図 11，図 12，図 13 の比較により 5 μm では薄く，10 μm は輪郭がわかる程度の厚さとなり，20 μm で十分な厚さであることが分かった。

4. 考察

得られた結果から、種子標本作製の条件検討の各項目を次のように考える。

種子は割無しでは観察に堪える標本にならないため、割は必要である。しかし割を入れた標本で種子内部に空胞がみられたことから、内部成分流出の可能性があり、更なる検討が必要である。

検討した条件の中で組織の形態が維持された良好な標本となったのは、固定した種子のみだったため、固定は必要であり乾燥種子は使用不可と考える。

植物試料で最適な切片の厚さは行う染色や使用目的によって変わることが想像されるが、最低でも 10 μ m 以上と考える。

5. おわりに

検討をとおして研究者の要望に応え、植物種子の標本作製に成功した。

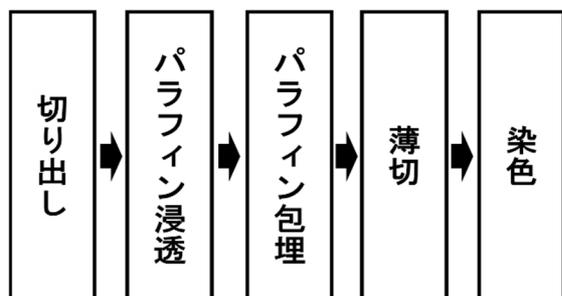


図1 生体試料標本作製プロトコール

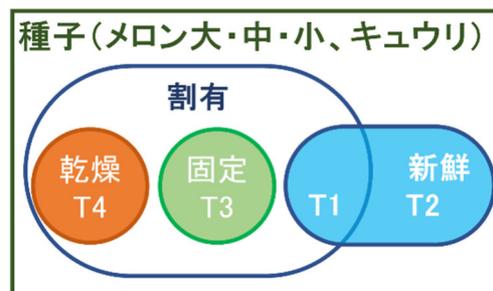


図2 切り出し作業まとめ



図3 メロン中 T1: 割有

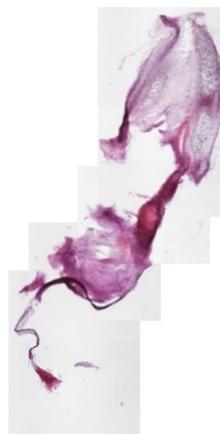


図4 メロン中 T2: 割無



図 5 メロン大
T1 : 割有

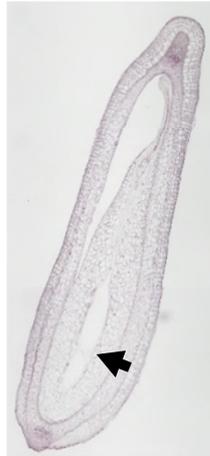


図 6 メロン大
T3 : 割・固定有



図 7 メロン大
T4 : 割・乾燥有

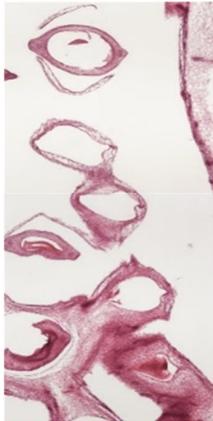


図 8 メロン小
T1 : 割有
図全体に欠損あり

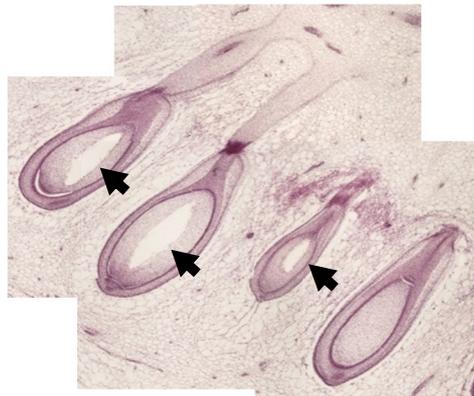


図 9 メロン小
T3 : 割・固定有
矢印部分に空胞あり

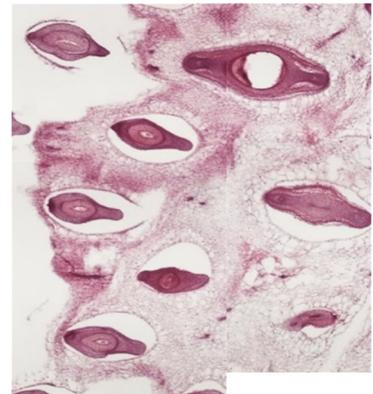


図 10 メロン小
T4 : 割・乾燥有
図全体に欠損あり



図 11 厚さ 20 μ m



図 12 厚さ 10 μ m



図 13 厚さ 5 μ m