

张新梅,董晓英,沈仁芳.水稻幼嫩根尖常规石蜡切片制作技术改良[J].江苏农业科学,2013,41(12):71-73.

# 水稻幼嫩根尖常规石蜡切片制作技术改良

张新梅<sup>1,2</sup>,董晓英<sup>1</sup>,沈仁芳<sup>1</sup>

(1.中国科学院南京土壤研究所/土壤与农业可持续发展重点实验室,江苏南京 210008; 2.中国科学院大学,北京 100049)

**摘要:**采用优化的石蜡切片制作方法,对不同苗龄水稻根尖进行石蜡切片与徒手切片,比较福尔马林-醋酸-乙醇(FAA)、卡诺氏和4%多聚甲醛3种不同固定液,以及不同固定时间的固定效果,试验结果表明:卡诺氏固定液固定的根系变形、细胞皱缩;4%多聚甲醛固定液固定的根系结构与徒手切片一致,固定水稻幼根的时间以1.5 h为最佳;4%多聚甲醛固定液的固定效果最好,优于FAA和卡诺氏固定液。

**关键词:**石蜡切片;固定效果;固定液;徒手切片;固定时间

**中图分类号:** Q94-34 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0071-02

石蜡切片技术是组织学常规制片技术中经典、应用最为广泛的方法<sup>[1-2]</sup>。常规的石蜡切片方法耗时长,从取材固定到封片制成玻片标本需要1周左右的时间,在实际应用中受到诸多限制。在许多应用领域,都对常规石蜡切片制片技术进行了改良,极大地缩短了石蜡切片的制作时间,例如适用于临床病理诊断的微波快速切片方法和超声波快速切片方法<sup>[3-4]</sup>,适用于免疫组化染色的快速石蜡切片方法<sup>[5-6]</sup>等。然而,石蜡切片制作方法是针对一般的组织材料,对于特殊的组织材料,因组织学特性差异,不能完全适用,由于植物材料与动物材料性质不同,微波快速切片、超声波快速切片等方法在植物上应用还比较少。

植物幼嫩根尖组织在一些逆境胁迫中如铝毒害,是最敏感、最早做出胁迫反应的部位<sup>[7]</sup>,因此,幼嫩根尖组织观察在研究植物胁迫反应及抗性中具有重要的作用。对于幼苗根尖这类幼嫩组织的切片制作,常规的固定、脱水、透明、渗蜡等过程不仅时间过长,工作效率低,且易对组织造成损伤。为此,针对水稻幼嫩根尖细胞含水量高、细胞壁纤维素含量较低及组织柔软的特点,对水稻幼嫩根尖切片的制作技术进行研究,以期组织形态学研究提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

4 d(根长2 cm左右)或5 d(根长3.6 cm左右)苗龄的水稻幼苗。

### 1.2 主要试剂

固定液:FAA(福尔马林-醋酸-乙醇)固定液(40 mL无水乙醇:30 mL水:15 mL冰乙酸:15 mL甲醛);卡诺氏固定液(Carnoy fixative)(80 mL无水乙醇:5 mL冰乙酸:15 mL氯仿);4%多聚甲醛固定液(简称PFA)(4%多聚甲醛;

0.1 mol/L,pH值为7.2的磷酸缓冲液)。

染色液:埃利希(Ehrlich)苏木精染液;1%伊红水溶液。

### 1.3 方法

1.3.1 取材和固定 用锋利的刀片在水稻根基部1.5 cm处切取2 mm的小段,分别放入FAA、卡诺氏固定液和4%多聚甲醛固定液中,分别固定20 min、1.5 h和24 h。卡诺氏固定液需要当天配制,多聚甲醛固定后用0.01 mol/L,pH值7.2的磷酸缓冲液冲洗。

1.3.2 脱水和透明 FAA固定后,于50%、75%、85%、95%的乙醇中进行梯度脱水;卡诺氏固定液固定后,于85%、95%的乙醇中进行梯度脱水;多聚甲醛固定后,于30%、50%、75%、85%、95%的乙醇中进行梯度脱水。各梯度脱水时间为10 min,最后均在无水乙醇中脱水2次,首次10 min,第2次5 min。然后,依次转入二甲苯和无水乙醇之比为1:2、1:1、2:1的混合液中分别透明10 min。最后,转入纯二甲苯中透明2次,每次约5 min,至根尖透明为止。为了便于定位透明后的根尖,可以在95%的乙醇梯度脱水时加入0.1%的伊红水染液。注意严格控制乙醇脱水和二甲苯透明时间,防止组织变硬、变脆影响切片效果。

1.3.3 包埋和切片 经过透明处理的根尖样本先后2次放入融化石蜡液中(石蜡提前融化冷却至65℃,高于石蜡熔点5℃),分别浸润1 h。包埋后的蜡块冷却后可直接切片或保存于4℃冰箱备用。用轮转式石蜡切片机(Leica-RM 2235, Germany)进行连续切片,厚度5 μm,切片50℃烤干。

1.3.4 HE染色和封片 取干燥切片进行脱蜡、反水、HE染色。切片放入二甲苯脱蜡15 min,2次脱蜡后,依次放入100%、95%、80%、70%乙醇中各2 min,在蒸馏水中洗3~5 s;放入Ehrlich苏木精染色10 min;1%氨水分色35 s后流水冲洗30 min;70%和90%乙醇中各脱水10 min;伊红染色5 min后以90%乙醇分色40 s。中性树脂胶封片后,切片在配备有LCD(Olympus-DP7, Japan)的光学显微镜(Olympus-BX51, Japan)下观察拍照。

1.3.5 徒手切片的制作 根段在FAA固定液中固定24 h,乙醇梯度脱水后储存于70%乙醇中。取出固定好的根段,在110倍体视显微镜(Olympus-16, Japan)下用双面刀片切成薄片(约100 μm),在光学显微镜下观察拍照。

收稿日期:2013-04-15

基金项目:国家杰出青年科学基金(编号:41025005)。

作者简介:张新梅(1982—),女,内蒙古阿拉善人,博士,从事植物铝毒害和耐铝机制研究。E-mail:xmzhang.2009@163.com。

通信作者:沈仁芳,研究员,博士生导师,主要从事植物营养和逆境生理研究。E-mail:rfshen@issas.ac.cn。

2 结果与分析

2.1 不同固定液对水稻幼根(4 d 苗龄)石蜡切片制作的固定效果

试验选用了 3 种性质不同的固定液。FAA 固定液, 又称万能固定液, 配制简单易行, 在植物形态解剖上应用极广, 为了防止因材料含水量过高, 与脱水剂中乙醇浓度相差太大而收缩, 本试验用 30% 乙醇代替 70% 乙醇; 卡诺氏固定液常用于根尖等幼嫩组织的固定, 具有极强的渗透力; 4% 多聚甲醛固定液性质较为温和, 能很好地固定组织细胞中水溶性的大多数肽类激素和蛋白质, 保存组织的抗原性和细微结构, 在免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 和免疫细胞化学 (immunocytochemistry, ICC) 试验中组织和细胞的固定得到广泛的应用。

采用 3 种固定液固定, 并且缩短脱水、透明、渗蜡等一系列步骤的时间, 从数小时至数分钟, 制得的永久切片染色清晰, 表皮以及细胞核被苏木精染成蓝黑色, 未见伊红所染的细胞质成分 (图 1、表 1)。因为水稻幼苗根尖含水量高达 90% 以上<sup>[8]</sup>, 胞内绝大部分为液泡所占据, 细胞质部分随着细胞膜被液泡挤压到细胞边缘, 紧贴着细胞壁内侧不能被分辨出来。

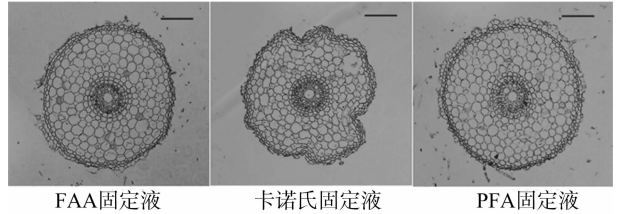


图1 不同固定液对水稻幼根(4 d 苗龄)石蜡切片标本制作固定效果比较(标尺=100 μm)

表 1 不同固定液对水稻幼根(4 d 苗龄)石蜡切片标本制作固定及染色效果的比较

固定液	组织结构	染色效果	核质对比
FAA 固定液	结构完整、清晰	染色鲜艳	对比明显
卡诺氏固定液	细胞皱缩、缺失	染色鲜艳	对比明显
PFA 固定液	结构完整、清晰	染色鲜艳	对比明显

由图 1、表 1 可见, 采用卡诺氏固定液固定的水稻根尖细胞全部发生皱缩, 根尖结构扭曲, 皮层有些部分甚至缺失; FAA 和 PFA 固定液固定效果良好, 切片结构保存完整, 细胞无变形。卡诺氏固定液配制时由于使用纯乙醇, 对于水稻幼苗根尖细胞 90% 的含水量来说, 乙醇浓度过高, 与组织细胞水分含量差异过大, 脱水速度过快导致细胞皱缩, 即使适当降低乙醇的纯度到 85% 时, 细胞皱缩也不可避免。

2.2 水稻幼根(5 d 苗龄)石蜡切片与徒手切片效果比较

随着水稻根系的发育成熟, 根系结构会发生相应的变化, 特别是随着水稻根系通气组织的形成, 以及皮层某些特定细胞开始酸化、解体、死亡, 这些细胞易于破损<sup>[9]</sup>。为了明确不同的固定液是否能保存好各个发育阶段的根系结构, 对不同固定液固定的石蜡切片与徒手切片进行效果比较。鉴于卡诺氏固定液固定效果明显不好, 因此, 只采用了 FAA 和 PFA 2

种固定液。

由图 2 可见, 徒手切片的 5 d 苗龄水稻根尖开始出现通气组织, 皮层部位的某些特定细胞也崩塌解体; FAA 固定液虽然能完整地固定幼嫩的根尖组织, 但是与徒手切片比较, 对 5 d 苗龄的根尖组织固定效果并不好, 根尖结构不完整, 有部分缺失, 缺失的部分面积远远大于徒手切片所显示的通气组织面积, 且缺失部位边缘模糊, 并不如徒手切片有着边缘清晰的通气组织; 用 PFA 固定液固定的 5 d 苗龄根尖结构无变形, 细胞未见缺失, 皮层部位可以观察到与徒手切片类似的通气组织与崩塌细胞。因此, 4% 多聚甲醛能够很好地保存组织细胞, 结构完整, 优于 FAA 固定和徒手切片。

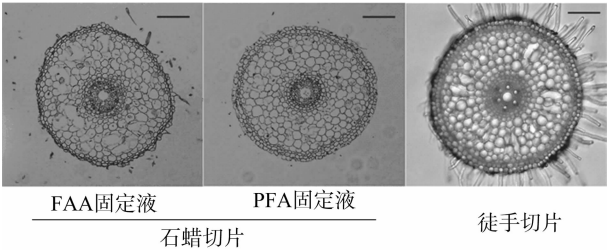


图2 水稻幼根(5 d 苗龄)石蜡切片与徒手切片效果比较(标尺=100 μm)

2.3 PFA 固定液不同固定时间对切片效果的影响

一般来说, FAA 固定液固定时间 24 ~ 48 h 内效果良好; 卡诺氏固定液渗透速度快, 固定时间较短, 15 ~ 20 min 即可; PFA 固定液固定时间为数小时, 主要取决于不同材料的性质。为了准确评估 PFA 固定液的固定时间对水稻幼苗根尖切片制作效果的影响, 对 PFA 固定液固定时间分别为 0.5、1.5、2.5 和 3.5 h 的一组 5 d 苗龄水稻根尖石蜡切片进行切片效果比较。由图 3 可见, PFA 固定液固定 1.5 h 时固定效果良好, 固定时间较短(0.5 h)或较长(2.5 h 和 3.5 h)都不能很好地固定根尖, 切片标本出现空腔、缺失, 时间太长(3.5 h)甚至发生皱缩变形。

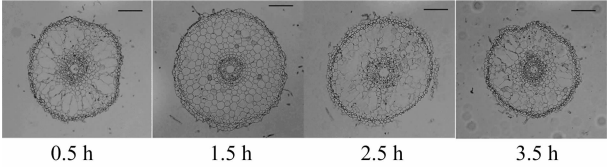


图3 PFA 固定液不同固定时间的石蜡切片效果比较(标尺=100 μm)

3 小结与讨论

固定是石蜡切片标本制作的关键环节, 其作用在于使蛋白质变性、凝固、沉淀, 保持细胞、组织的原有形态<sup>[10]</sup>。固定液中化学成分的渗透力、pH 值、渗透压和固定时间等诸多因素影响固定液的固定效果<sup>[11]</sup>。

卡诺氏固定液渗透力太强, 不适用于含水量过高幼嫩根尖的固定; FAA 固定液中所含的冰乙酸, 能使此时期某些本就很敏感的细胞处于酸性环境中, 再经过后续复杂的处理过程, 这种微环境的变化使得细胞的多种成分极易发生自溶, 导致根尖结构皮层部位有所缺失, 这一推测有待采用其他中性固定剂如中性甲醛固定液等进一步验证, FAA 固定液不适合固定处于某个特定发育阶段的水稻根尖; PFA 固定液由中性

马行军,王全领,钱海艳,等. 淮北夏玉米全程机械化高产栽培技术[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):73-74.

# 淮北夏玉米全程机械化高产栽培技术

马行军,王全领,钱海艳,杨 波

(江苏省丰县农业技术推广中心,江苏丰县 221700)

**摘要:**随着国家农机购置补贴政策的实施,各级政府和农机部门的因势利导,玉米生产机械化生产水平得到了显著提高,实施玉米全程机械化高产栽培技术已是发展现代农业的必然选择。本文从适期板茬带肥机条播技术(包括农艺要求、机具要求)、田间管理技术(包括合理密植、施肥原则、施肥量、施肥时期、灌溉、病虫草害综合防治)、机械适时晚收技术(包括机具选择、适时收获)等方面,概述了淮北夏玉米全程机械化高产栽培技术。

**关键词:**玉米;全程机器化;栽培技术;播种;田间管理;机械化收获

**中图分类号:** S513.048 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0073-02

玉米机械化生产不仅可以有效减轻农民劳动强度,节约大量劳动力,改善农民生产条件,支持农村劳动力转移,推进新农村建设步伐,而且可以实现节本增效,增加农民收入,稳定种粮面积,确保粮食生产安全<sup>[1-2]</sup>。淮北夏玉米生产机械化水平位于全国中等水平,淮北地区特别是江苏省丰县玉米播种、收获等机械化水平相对较高。丰县从 1998 年开始进行玉米免耕板茬机播和秸秆还田试验示范,2002 年开始进行玉米联合收获的试验示范,2008 年机播率 85%、机收率 40%,2010 年播种基本全部实现机械化,机收率在 85% 以上,2012 年基本全面实现了玉米生产全程机械化。玉米全程机械化生产主要包括玉米贴茬免耕机械化播种、田间管理、机械化收获等工序。

收稿日期:2013-10-21

作者简介:马行军(1973—),男,高级农艺师,从事农业技术推广工作。Tel:(0516)89207393;E-mail:fxnljma@163.com。

的 PBS 配制而成,整个固定液显中性,与植物细胞本身的酸碱性一致,不会破坏材料的组织结构,因而固定的细胞结构完整,为制作水稻幼嫩根尖切片的理想固定液。

针对水稻幼嫩根尖的特点,将脱水、透明、渗蜡的时间由数小时调整至几分钟,使固定后过程由 7 d 缩短为 5 h 左右,极大地节省了时间,提高了工作效率,采用改进后的方法所制得的切片效果良好。为了缩短处理时间,固定的组织材料要切得足够小,以加快脱水、透明、渗蜡的速度。对植物幼嫩组织的固定一直是难点,该方法不仅解决了幼嫩根尖石蜡切片的制作,而且还适用于成熟组织的切片制作。当然,对不同材料的制作方法,因材料性质的不同,每一步骤所需的时间还需做相应的调整。

## 参考文献:

- [1] 张锦生. 现代组织化学原理及应用[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2003:12-18.
- [2] 彭喜旭,周平兰,唐新科,等. 镍胁迫下水稻幼苗木质素含量变化及组织化学显示[J]. 江苏农业科学,2011,39(6):121-122.
- [3] 魏欣悦,苏 源,杨 静,等. 微波快速石蜡切片法观察水稻叶片组织[J]. 云南农业大学学报:自然科学版,2011,26(04):454-

## 1 适期板茬带肥机条播技术

### 1.1 农艺要求

1.1.1 小麦秸秆覆盖 玉米播种前,联合收割机(新疆 2 号、福田谷神等)收获小麦,小麦秸秆留茬高度应低于 15 cm,秸秆粉碎后均匀抛撒于地表,小麦秸秆全量还田,覆盖率大于 95%。使用多功能免耕施肥播种机播种玉米,秸秆覆盖率低于 60%;使用玉米贴茬播种机播种,小麦秸秆覆盖率低于 70%。

1.1.2 品种选择 选择统一的高抗耐密植高产良种,如苏玉 20、郑单 958 等。

1.1.3 种子精选及处理 选用符合国家标准种子,并选择高效低毒无公害的玉米种衣剂对种子进行包衣处理。

1.1.4 播种时间 淮北夏玉米应在 6 月 15 日左右集中播种,以避免粗缩病的发生,以便于统一收获和田间管理。

457,478.

- [4] 刘筱青. 术中快速病理诊断乳腺肿瘤中超声波快速石蜡切片的应用[J]. 中国现代医生,2011,49(14):104-105.
- [5] 张 伟,周永梅,陈明城,等. 快速石蜡切片法在免疫组化染色中的应用[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2011,20(4):372-373.
- [6] 周永梅,陈明城,赖续文,等. 快速石蜡切片在小块活检组织中的应用[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2011,20(1):101-102.
- [7] Ryan P R, Delhaize E, Randall P J. Malate efflux from root apices and tolerance to aluminium are highly correlated in wheat[J]. Australian Journal of Plant Physiology, 1995, 22(4): 531-536.
- [8] 宋金敏,刘 鹏,徐根娣,等. 水稻根尖边缘细胞对铁胁迫的缓解效应[J]. 中国水稻科学,2009,23(5):503-508.
- [9] Drew M C, He C J, Morgan P W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots[J]. Trends in Plant Science, 2000, 5(3): 123-127.
- [10] 龚志锦,詹谔洲. 病理组织制片和染色技术[M]. 上海:上海科学技术出版社,1994:32-36.
- [11] 孙海梅,尚宏伟,张立新,等. 不同固定液对大鼠脾石蜡切片 HE 染色标本的影响[J]. 中国医学装备,2011,8(10):48-50.