

# 作物初生根不同发育时期通气组织形成的石蜡切片与徒手切片的比较观察<sup>①</sup>

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

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

**摘要:**应用石蜡切片方法和徒手切片方法, 通过对水稻幼苗根系通气组织发育的观察, 比较两种切片的异同。结果显示: 石蜡切片和徒手切片都能清楚显示水稻根系通气组织的结构; 并由此确定了水稻幼根通气组织形成过程, 具体为: 4 天苗龄的水稻幼苗根系在培养 24 h 后开始形成通气组织, 72 h 时通气组织发育成熟。越靠近根基的部位, 植株组织发育更成熟, 通气组织的发育程度也更高。相比于石蜡切片, 徒手切片方法更适用于水稻根系通气组织结构的观察。进一步利用徒手切片方法比较水稻和小麦根系通气组织形成对低氧的反应, 发现低氧显著诱导麦根通气组织的形成, 而对稻根通气组织发育的促进作用不明显。

**关键词:**石蜡切片; 徒手切片; 通气组织; 低氧

**中图分类号:** Q945.4

水稻(*Oryza sativa*)是世界上重要的粮食作物, 生活在旱湿交替的环境中, 具有较强的耐涝能力, 这种特性与根系中发达的通气组织(aerenchyma)密切相关<sup>[1-2]</sup>。不同于小麦(*Triticum aestivum*)根系的通气组织受淹水或低氧诱导生成<sup>[3]</sup>, 水稻根系通气组织的发育属典型的组成型, 在根系中的形成是否受外界刺激诱导还没有定论<sup>[4-5]</sup>。水稻或小麦根内溶生性通气组织的形成开始于根皮层部位的某些特定细胞的自溶, 类似于细胞的程序性死亡<sup>[6-7]</sup>。而处于通气组织形成初期的作物根系, 由于细胞的这种消亡, 利用常规石蜡切片方法往往难以制作出结构完整、美观的根尖切片, 表现为组织皱缩、严重变形、某些部位缺失, 严重影响对结果的评价与判断。我们通过对固定液的选择, 改进常规的固定、脱水、透明和渗蜡程序后, 成功制成效果优良的水稻幼嫩根系的石蜡切片, 有助于揭示水稻幼根的解剖学特征。本研究利用水稻幼根的石蜡切片与徒手切片方法, 比较观察稻根通气组织的发育, 以确定更适合用来观察作物根系通气组织结构的切片方法; 同时利用徒手切片技术观察水稻和小麦根系通气组织发育对低氧胁迫的反应。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料培养

水稻(*Oryza sativa* L.)kasalath 种子经消毒、浸种、催芽后, 播种于漂浮在 0.5 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液中的浮板上。播种 2 天后, 选择根长 2 cm 的水稻幼苗, 转移至 1.5 L 0.5 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液中继续培养 3 天, 每盆 15 株苗, 期间每天更换培养液。将初生根根基以下 2 cm 的长度分为两部分, 根基远端 1~2 cm 的部分为 section I, 而近端 0~1 cm 的根段为 section II。分别于培养的第 0、1、2、3 天时, 在 section I 和 section II 的中部切取 2 mm 的小段, 即在距根基 15 mm 和 5 mm 的部位切取根段材料, 制作石蜡切片和徒手切片。

低氧处理: 水稻(*Oryza sativa* L.)Kasalath 和小麦(*Triticum aestivum* L.)Atlas 幼苗根系长至 2 cm 后, 转移到 1.5 L 0.5 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液中, 每盆 15 株苗, 同时向培养液中通入纯氮气(96%), 流速 60 ml/min, 对照通入空气, 培养 3 天, 期间每天更换培养液。培养液中的氧含量用便携式溶解氧测定仪(雷磁 IPB-607A, 上海精密科学仪器有限公司)进行测定。培养结束后, 在水稻和小麦主初生根(primary

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(No. 41025005)资助。

\* 通讯作者(rfshen@issas.ac.cn)

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

root)section I 中部(距根基 15 mm)切取根段制作徒手切片观察。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 固定液配制** 中性多聚甲醛固定液(40 g/L paraformaldehyde fixative, PFA 固定液): 称取 40 g 多聚甲醛, 溶于 500 ml 磷酸缓冲液(PBS, 0.1 mol/L, pH 7.2), 加入数滴 NaOH, 在磁力搅拌器上加热至 60℃ 搅拌溶解(在通风橱内进行)。约数小时后至溶液清亮, 冷却至室温, 加入 PBS 定容至 1 000 ml, 用 HCl 调节 pH 至 7.2。

FAA(福尔马林-冰乙酸-酒精)固定液: 370 g/L 甲醛 15 ml, 冰乙酸 15 ml, 750 g/L 乙醇 70 ml。

**1.2.2 切片的制作** 石蜡切片的制作: PFA 固定液固定 1.5 h, 经梯度酒精脱水、二甲苯透明、渗蜡、包埋后切片, 切片经苏木精-伊红(H-E)染色后中性树脂封片。

徒手切片的制作: FAA 固定液固定 24 h, 酒精梯度脱水后储存于 70% 酒精中。取出固定好的根段, 在 110 倍体视显微镜(Olympus-16, Tokyo, Japan)下用双面刀片切成薄片(约 100 μm)后在配备 LCD(Olympus-DP7, Tokyo, Japan)的光学显微镜(Olympus-BX51, Tokyo, Japan)下观察拍照。

**1.2.3 通气组织面积计算** 通气组织照片用 Image J 1.46e 软件进行分析, 通气组织面积按以下公式计算:

$$\text{通气组织面积}(\% \text{皮层横截面积}) = [\text{通气组织面积} / (\text{皮层横截面总面积} - \text{中柱面积})] \times 100$$

## 2 结果和分析

### 2.1 水稻根系石蜡切片和徒手切片观察通气组织发育的比较

通过前期的预备试验, 我们于水稻初生根长至 2 cm 左右开始进行实验, 同时确定了两个取样部位 section I 和 section II 的中部(图 1)为石蜡切片和徒手切片的观察部位。

石蜡切片与徒手切片都显示在移苗前(0 h), section I 和 section II 中部均未发现有通气组织的形成, 皮层细胞呈圆形, section I 部位的细胞大小均匀, section II 部位中贴近表皮内侧的 2~3 层细胞稍有膨大(图 2, 表 1)。两个部位于移苗后 24 h 都开始形成通气组织, 皮层的中部出现少量空腔和崩塌细胞。石蜡切片与徒手切片 section I、section II 部位的空腔面积分别为 12%、23% 和 9%、21%, section II 部位的通气组织面积明显较 section I 中的多(图 2, 表 1)。



图 1 根段切片制作取样部位图示  
Fig. 1 Sampling position of root section

随着时间的延长, 两部位通气组织面积及崩塌细胞区域都由皮层中部向内外两侧不断扩展, 细胞壁相互融合, 72 h 时形成发达的通气组织。此时, section II 中的通气组织发育程度仍旧比 section I 略高, 石蜡切片 I、II 两部位通气组织区域分别为 28%、33%, 而徒手切片分别为 26%、29%, 其中, 石蜡切片 section I 和 section II 通气组织面积差异显著(图 2, 表 1)。在 72 h 时根系内通气组织继续增大, 尤其是在 section II 部位, 形成了完全成熟的通气组织, 只剩一串或数串连接中柱和外皮层的细胞保持完整, 将相邻的两个空腔隔开(图 2)。总体来说, 较接近根基的部位(section II)发育程度较高, 根基远端部位(section I)发育程度较低, 所以相比于 section I, section II 通气组织面积更加发达, 这与 Kawai 等<sup>[7]</sup>的研究结果一致。结果表明, 水稻根系的通气组织形成非常快, 在发芽数天后就可形成发达的通气组织。

以上结果也显示, 石蜡切片显示的通气组织面积一般均较相同部位徒手切片显示的面积大, 尤其在 72 h, 石蜡切片的两部位(section I 和 section II)通气组织分别为 38% 和 59%, 显著高于徒手切片的两部

表 1 稻根通气组织面积的石蜡切片和徒手切片比较 (%皮层横截面积)

Table 1 Comparison of area of aerenchyma in rice primary root between paraffin section and freehand section

时间 (h)	石蜡切片		徒手切片	
	Section I	Section II	Section I	Section II
0	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 h
24	12.19 ± 1.29 g	23.10 ± 2.76 f	8.69 ± 1.41 g	21.04 ± 3.40 f
48	27.90 ± 1.43 e	33.48 ± 2.08 d	25.50 ± 2.52 ef	29.06 ± 2.81 de
72	38.64 ± 2.41 c	59.47 ± 5.60 a	33.11 ± 2.49 d	46.11 ± 2.77 b

注: 表中数据为平均值 ± SD, 小写字母不同表示差异达到  $P < 0.05$  显著水平。

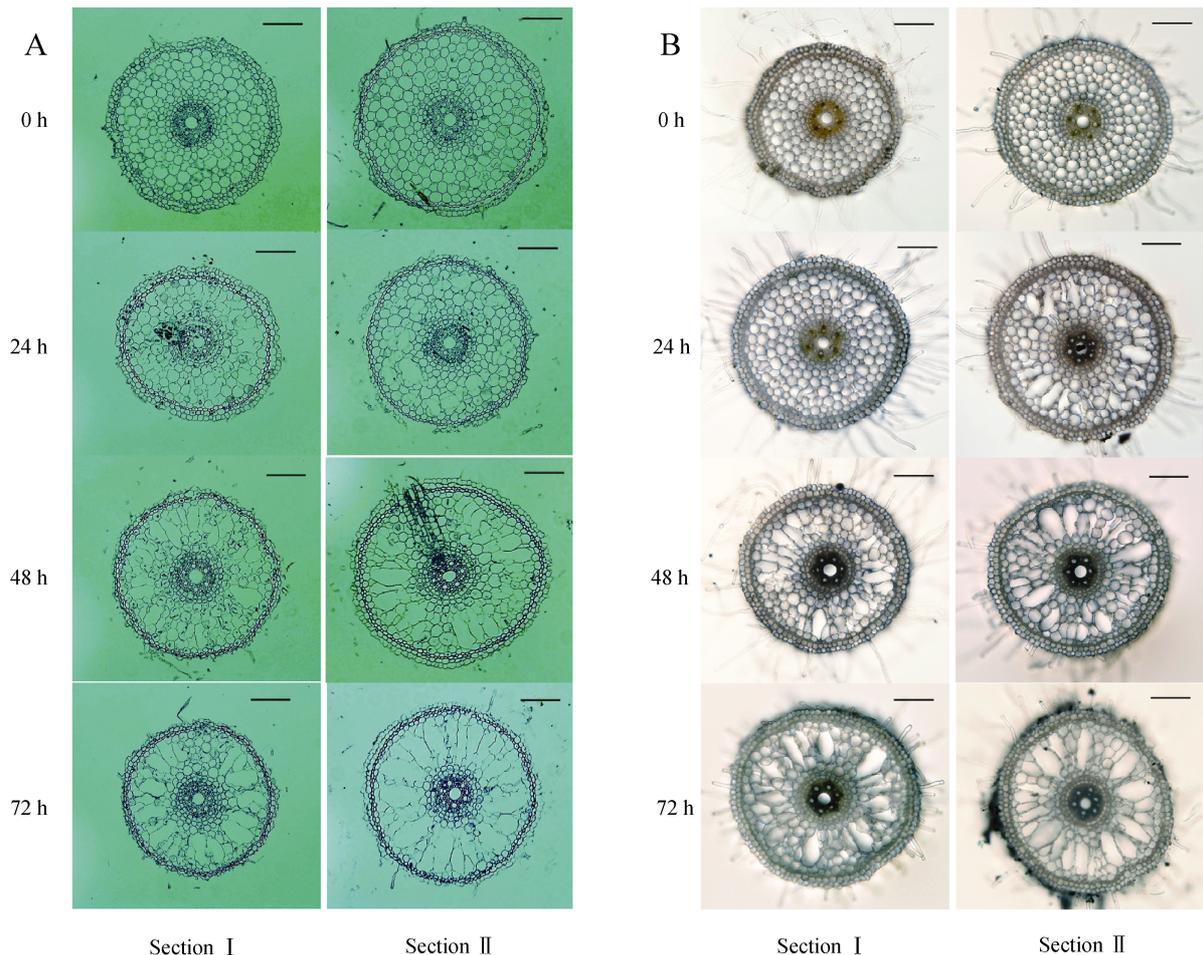


图 2 石蜡切片(A)和徒手切片(B)观察水稻根系通气组织结构发育( $\times 200$ )(标尺 = 100  $\mu\text{m}$ )  
Fig. 2 Observation of aerenchyma tissue development in rice root by paraffin section (A) and freehand section (B) ( $\times 200$ )

位(分别为 33% 和 46%)(图 2, 表 1)。这可能是由于在通气组织形成过程中, 随着石蜡切片制作导致微环境的变化加剧了细胞的自溶。特别是在通气组织发育成熟末期(72 h), 大面积空腔已经形成, 而仅有的少量细胞也有部分处于自溶末期, 石蜡切片制作的处理更加剧了细胞的自溶。因此, 相比较于石蜡切片, 徒手切片更能真实地反映水稻根系的结构和通气组织发育。

## 2.2 徒手切片观察低氧(hypoxia)对作物通气组织形成的影响

低氧处理采用 Chang 等<sup>[8]</sup>的方法并加以适当改动, 用便携式溶解氧测定仪监测对照和处理培养液的溶解氧含量, 结果如表 2 所示。通入空气的对照培养液, 在 3 天的实验期内, 溶解氧都维持在 7.1~7.3 mg/L 之间, 接近空气中的氧含量(7.82 mg/L, 28 $^{\circ}\text{C}$ ), 表明对照培养液的含氧量充足。而通氮处理培养液含氧量仅为 1.1~1.2 mg/L, 与 Huang 等<sup>[9]</sup>低氧处理培养液的含氧量 0.9 mg/L 相近, 仅为对照的 16% 左右, 植物处于缺氧状态。

表 2 培养液中溶解氧含量  
Table 2 Dissolved oxygen content in solution

时间 (d)	溶解氧含量(mg/L)	
	对照	低氧
1	7.3	1.2
2	7.1	1.2
3	7.1	1.1

结果表明, 在距根基 15 mm 处, 对照和低氧处理的水稻根皮层部都有大量的通气组织空腔形成, 分别占皮层总面积的 23% 和 26%(图 3, 图 4)。数据显示, 尽管低氧处理的水稻根系通气组织面积略高于对照, 但没有达到显著差异水平(图 4)。而对照的小麦根系由于氧气充足, 虽然有少部分的根系皮层偶尔会出现极少数的空腔, 这些空腔在皮层所占的面积极小, 仅占皮层面积的 0.5%(图 3, 图 4), 基本上未发现真正意义上的通气组织出现。低氧处理的小麦根系皮层中部细胞大量消失, 出现大面积中空的气腔结构, 占到皮层横截面积的 17% 左右(图 4)。

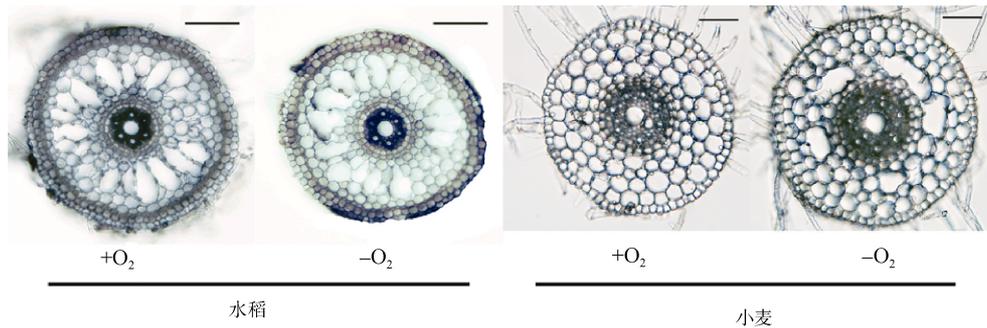
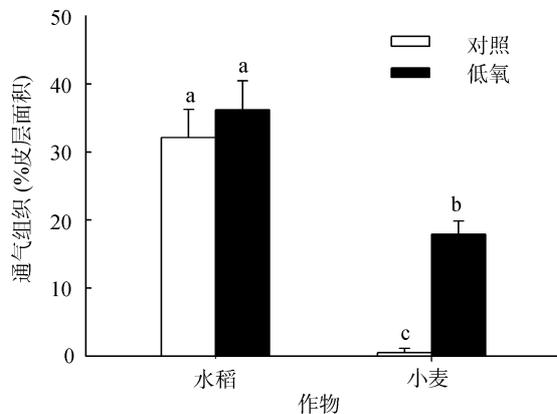


图 3 徒手切片观察低氧条件下水稻和小麦通气组织结构发育( $\times 200$ )(标尺=100  $\mu\text{m}$ )

Fig. 3 Observation of aerenchyma tissue development in rice and wheat root treated with hypoxia by freehand section ( $\times 200$ )



(图中小写字母不同表示差异达到  $P < 0.05$  显著水平,  $n = 10$ )

图 4 低氧条件下水稻和小麦根系通气组织形成面积的比较  
Fig. 4 Comparison between area of aerenchyma formed in rice and wheat root under hypoxia

以上结果表明,利用徒手切片方法对稻、麦根系的 结构观察,证实了低氧诱导小麦通气组织的形成, 同时也发现低氧对稻根通气组织发育的促进作用不 明显。这是因为通气组织的发育是水稻根系发育过程 的组成部分,即使没有外界因素的诱导也会产生,而 适当的外界条件在一定程度上也可以加速稻根通气 组织的发育(图 3, 图 4)。但是因为稻根通气组织发 育早期的细胞自溶过程类似于细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD)过程,由某种内源机制 触发,通过一系列事件的次序发生,需要一定的时 间才能表现<sup>[6-7]</sup>。外界刺激加速稻根通气组织的形 成,仅仅是提前感知这种刺激并通过内源机制加以触 发,并不能加速通气组织形成过程的每一个步骤,包 括根皮层细胞的程序化死亡以及后期的细胞间隙的扩 大。因此,我们的实验条件下,低氧对稻根通气组织 的诱导不明显。采用更加精确的根系观察方法,如 X 射线体层摄影技术<sup>[10]</sup>,能够原位无损伤观测三维的根 系通气组织结构及其形成,减少观测和数据分析的误 差,使得到的结果更准确,从而表现出对照与低氧在 通气组织发育促进方面的差异。在氧气充足的情况

下,旱地作物小麦的根系没有通气组织结构的出现, 而处于缺氧环境,麦根则会产生大量通气组织,来运 输地上部的氧气到根部,维持根内适宜的氧水平,以 保障正常的生理功能<sup>[2, 6, 11]</sup>。

### 3 讨论和结论

石蜡切片与徒手切片手段都可以用来观察组织 细胞结构。石蜡切片技术通过对新鲜材料的固定、脱 水、透明和渗蜡等一系列步骤后,制作成切片标本来 观察目标材料的结构,所制成的切片可以永久保存, 还可以利用不同的染色剂将细胞的不同成分染上不 同的颜色,达到对组织和细胞内不同的组分进行辨 认。然而,常规的石蜡切片技术制作过程各步骤所需 时间过长(一周左右),易对植物组织造成损伤,并不 适用于植物幼嫩组织,例如幼嫩根尖的切片制作;另 一方面,常规方法制作一张石蜡切片需要 7 天左右, 实验耗时过长,不利于工作效率的提高。因此,针对 如上特点,同时考虑到稻根通气组织发育时期细胞自 溶的特点,我们应用中性和多聚甲醛固定液,保持制片 过程中细胞的生理环境是中性,使根系形态得到极大 程度上的完好保存。其次,我们在常规石蜡切片技术 的基础上,缩短脱水、透明和渗蜡 3 个过程的时间(由 数小时至 5~10 min),极大地缩短了制片时间,使石 蜡切片的制作由一周缩短为 5 h。而徒手切片技术的 优点在于可以观察新鲜材料组织的活体细胞结构状 态,还能于固定后存放在 700 g/L 的乙醇中长期保存, 既避免了石蜡切片的繁琐过程,又可以不局限于新鲜 材料的观察,多加练习可快速掌握其技能。

石蜡切片是组织学形态观察所采用的最常用的 方法,通过与其他新的技术方法结合,开辟了一些新 领域,使传统方法得到了更广泛的应用。例如与免疫 组化技术结合检测常规或特殊染色法难以显示的成 分及其精确定位<sup>[12]</sup>;与流式细胞术(flow cytometry, FCM)结合,用来测量 DNA 含量和倍体分析<sup>[13]</sup>;还

可用于原位核酸分子杂交技术,检测材料中被杂交的 DNA 分子进行定位、含量分析和观察<sup>[14]</sup>;与聚合酶链式反应(PCR)技术结合进行 DNA 分析<sup>[15]</sup>。而徒手切片可以用于活体细胞染色、荧光放射的观察,例如,通气组织形成过程中的酸化细胞和死亡细胞的中性红(Neutral red)和伊文思蓝(Evans blue)染色<sup>[7]</sup>;显示共质体铝离子累积的桑木素(Morin)染色<sup>[16]</sup>,这是石蜡切片不能够做到的。

综上所述,根据不同的实验目的采用不同的实验方法,可以针对性地解决问题。针对作物根系通气组织的观察,徒手切片制作程序简单、速度快,节约了制片成本的同时也提高了工作效率;并且材料经过固定后,不限于新鲜材料的即时观测,在不需要大批量制作切片的情况下是更合适的切片制作方法。

#### 参考文献:

- [1] Colmer TD. Long-distance transport of gases in plant: A perspective on internal aeration and radio oxygen loss from roots [J]. *Plant Cell and Environment*, 2003, 26: 17–36
- [2] 张晓艳, 马静, 李小平, 徐华, 蔡祖聪. 稻田甲烷传输的研究进展[J]. *土壤*, 2012, 44(2): 181–187
- [3] Malik AI, Colmer TD, Lambers H, Schortemeyer M. Aerenchyma formation and radial O<sub>2</sub> loss along adventitious roots of wheat with only the apical root portion exposed to O<sub>2</sub> deficiency[J]. *Plant Cell and Environment*, 2003, 26(10): 1 713–1 722
- [4] Justin SHFW, Armstrong W. Evidence for the involvement of ethene in the aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *The New Phytologist*, 1991, 118: 49–62
- [5] Jackson MB, Fenning TM, Jenkins W. Aerenchyma (Gas-space) formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.) is not controlled by ethylene or small partial pressure of oxygen[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1985, 36(10): 1 566–1 572
- [6] Evans DE. Aerenchyma formation[J]. *The New Phytologist*, 2003, 161: 35–49
- [7] Kawai M, Samarajeewa PK, Barrero RA, Nishiguchi M, Uchimiya H. Cellular dissection of the degradation pattern of cortical cell death during aerenchyma formation of rice root[J]. *Planta*, 1998, 204: 277–287
- [8] Chang WWP, Huang L, Shen M, Webster C, Burlingame AL, Roberts JKM. Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry[J]. *Plant Physiology*, 2000, 122: 295–317
- [9] Huang SB, Greenway H, Colmer TD, Millar AH. Protein synthesis by rice coleoptiles during prolonged anoxia: Implications for glycolysis, growth and energy utilization[J]. *Annals of Botany*, 2005, 96: 703–715
- [10] Karahara I, Umemura K, Soga Y, Akai Y, Bando T, Ito Y, Tamaoki D, Uesugi K, Abe J, Yamauchi D, Mineyuki Y. Demonstration of osmotically dependent promotion of aerenchyma formation at different levels in the primary roots of rice using a sandwich method and X-ray computed tomography[J]. *Annals of Botany*, 2012, 110(2): 503–509
- [11] 孔好, 王忠, 顾蕴洁, 熊飞, 陈刚, 韩鹰. 乙烯利诱导水稻根内通气组织形成的研究[J]. *植物学通报*, 2008, 25(2): 248–253
- [12] 王文勇, 邓南生, 张志培, 赵一岭, 马福成. 用细胞爬片和石蜡切片对 HCV 核心蛋白进行免疫组化染色的比较[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(3): 392, 397
- [13] 王乃宁, 宋连芬, 马文香, 顾方六, 薛绍日, 宋平根. 流式细胞术脱石蜡技术在泌尿系统肿瘤研究中的应用[J]. *北京医科大学学报*, 1989, 21(4): 337–339, 16
- [14] 孙保存, 刘易欣, 赵秀兰, 蔡春友, 阎雪燕, 王欣. 应用端粒酶原位杂交技术检测大肠癌端粒酶活性[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2002, 18(1): 109–110
- [15] 李秀武, 李幸彬, 杜秀然, 贾晨光, 陈荣娟. 石蜡包埋组织实时荧光定量聚合酶链式反应检测在结核病诊断中的价值[J]. *中国防痨杂志*, 2010, 32(5): 272–274
- [16] Klug B, Specht A, Horst WJ. Aluminium localization in root tips of the aluminium-accumulating plant species buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(15): 5 453–5 462

## Comparative Observation of Aerenchyma Formation During Different Crop Primary Root Developmental Stage by Paraffin Section and Freehand Section

ZHANG Xin-mei<sup>1,2</sup>, DONG Xiao-ying<sup>1</sup>, SHEN Ren-fang<sup>1\*</sup>

(1 *State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China*; 2 *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

**Abstract:** We observed the aerenchyma formation in rice primary root and compared the images obtained by paraffin section and freehand section methods. The results showed that, both of the section types were able to display the structure of rice root and the formation of aerenchyma tissue clearly. The aerenchyma in roots of 4-d old rice seedlings began to form after 24 h growth, and came to completely mature by 72 h. The more closer to the root basal portion, the more mature of the tissue, consequently the higher degree of the aerenchyma development. Compared to paraffin section method, the freehand section method is more suitable for observation of the architecture of aerenchyma in rice root. Aerenchyma production in rice and wheat root upon hypoxia observed by freehand section method showed that hypoxia can significantly induce aerenchyma formation in wheat roots, whereas the promoting function in rice roots is not significant.

**Key words:** Paraffin section, Freehand section, Aerenchyma, Hypoxia