

文章编号: 1674-7054(2014)01-0067-06

# 一种用于观察木薯显微结构的冰冻切片技术

刘雪辉<sup>1</sup> 张世鑫<sup>1,2</sup> 杨鹏<sup>1,2</sup> 田维敏<sup>2</sup>

(1. 海南大学 应用科技学院 海南 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 橡胶研究所/农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室/海南省热带作物栽培生理学重点实验室 海南 儋州 571737)

**摘要:** 采用直接包埋法冰冻切片、蔗糖保护法冰冻切片和石蜡切片3种方式对木薯的根、茎、叶等组织进行切片,并在显微镜下观察和拍照。结果表明,在合适的蔗糖浓度下,蔗糖保护法用于木薯不同器官的冰冻切片,可以真实的反映细胞的显微结构,且切片组织完整性和图片清晰度效果良好。

**关键词:** 木薯; 冰冻切片; 石蜡切片; 显微结构

中图分类号: Q-336 文献标志码: A

木薯(*Manihot esculenta* Crantz.) 是大戟科木薯属一年或多年生直立灌木,与红薯、马铃薯合称3大薯类作物<sup>[1-2]</sup>,为全球7亿人口提供基本的食物<sup>[3-4]</sup>。木薯在食品、饮料、医药、纺织(染布)、造纸、饲料等方面均有重要用途,现已成为我国南方地区广泛栽培的热带作物<sup>[5]</sup>。冰冻切片(Cryo-sectioning)是一种在低温条件下使组织快速冷却到一定硬度,然后进行切片的方法。该方法较石蜡切片法快捷、简便,且使用幼嫩组织和肉质组织切片能保存细胞内水溶性和脂溶性内含物,因此,在动物和人体的研究中得到广泛应用<sup>[6-8]</sup>。相对于动物和人体的细胞,植物细胞有细胞壁和大液泡,且细胞的含水量远大于动物和人体细胞的含水量。所以,冰冻后的植物组织硬度大且易产生冰晶,切片时容易破坏植物组织,切片困难或不容易保持切片中植物组织的完整性。目前,仅有少量文献对冰冻切片技术应用于植物组织和器官进行了报道<sup>[9-21]</sup>。笔者采用直接包埋法冰冻切片、蔗糖保护法冰冻切片和石蜡切片3种方式对木薯的根、茎、叶等组织进行切片,并在显微镜下观察和拍照,旨在为热带作物的形态解剖学研究寻找简便、快速、高效的切片技术提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 植物材料** 供试的木薯品种为华南7号,种植于中国热带农业科学院试验场九队。每年冬季挖薯后,以茎段埋于土里,春季自然发芽生长。选取块根成熟期的健壮木薯植株,取距植株顶端20 cm处的茎和叶,以及地下20 cm处的块根及须根为实验材料。

**1.2 石蜡切片** 切取5 cm×5 cm大小的新鲜木薯叶片、茎皮、块根组织,置于FAA固定液( $\varphi = 80\%$ 的乙醇:甲醛:乙酸=90:5:5)(V/V)中,真空抽气10 min;然后固定24 h;酒精系列脱水,每级1 h;正丁醇系列透明,每级2~3 h;透蜡,每级3~4 h;石蜡包埋。切片厚度12~14  $\mu\text{m}$ ,固绿衬染。

**1.3 直接包埋法冰冻切片** 直接包埋法冰冻切片是一种冰冻切片的常规方。将分割好木薯叶片、茎皮、块根组织,直接用OCT包埋胶包裹在样品坩上,于冰冻切片机的载物台上( $-18 \sim -20 \text{ }^\circ\text{C}$ )冰冻成形,然后恒温切片(Leica CM1900冰冻切片机)。切片厚度为10~16  $\mu\text{m}$ ,切片机冷冻头温度为 $-18 \sim -20 \text{ }^\circ\text{C}$ 。切片直接粘附于干净的载玻片上,用 $\varphi = 5\%$ 甘油封片,染色或不染色,在显微镜(Leica DMLB)下观察并拍照。

收稿日期: 2014-03-14

基金项目: 国家自然科学基金(31170642); 农业部橡胶树生物学重点实验室/省部共建国家重点实验室培育基地-海南省热带作物栽培生理重点实验室开放课题项目(KLOF0906)

作者简介: 刘雪辉(1991-),女,海南大学应用科技学院2012级本科生。E-mail: zhangshixin\_1@163.com

通信作者: 田维敏(1965-),男,教授,博士生导师。研究方向: 橡胶树乳管细胞生物学。E-mail: wmtian@163.com

1.4 蔗糖保护法冰冻切片 将分割好木薯叶片、茎皮、块根组织投入含  $\varphi = 4\%$  戊二醛、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.2) 的固定液中, 经 5 ~ 10 min 真空处理后, 于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下固定 6 ~ 8 h 或过夜。样品用磷酸缓冲液浸洗 3 次, 再用从低到高浓度 (2% ~ 20%) 的蔗糖 - 磷酸缓冲液逐级渗透, 每级浓度的渗透时间为 30 min。然后分别取经每级浓度蔗糖溶液渗透的样品用包埋剂包裹在样品坩上, 冰冻切片过程同上。

## 2 结果与分析

2.1 最佳蔗糖浓度 植物不同组织的细胞结构不同, 在冰冻切片过程中选择最合适的蔗糖浓度对保持冰冻切片的完整性至关重要。适合于木薯根、茎、叶的最适蔗糖浓度见表 1。植物组织的含水量与替代使用的蔗糖浓度成正比, 但需控制在一定范围内。蔗糖浓度过高会导致材料冻结效果不佳, 切片困难。

表 1 木薯不同器官的最适蔗糖浓度

Tab. 1 Optimal sucrose concentrations for cryoprotection of different organs of *Manihot esculenta*

器官 Organ	最适蔗糖浓度 / % Optimal sucrose concentration
块根 Root	12 ~ 15
须根 Fibrous root	10 ~ 12
茎 Stem	10 ~ 12
叶片 Leaf	10 ~ 12
叶柄 Petiole	8 ~ 10

2.2 3 种切片方法的比较 以木薯叶片、茎皮、块根组织为材料, 使用 3 种不同方法进行切片, 比较 3 种方法的优劣。

从切片的时间和可操作性来比较, 直接包埋法冰冻切片不需要前期处理, 完成时间最短, 约 2 ~ 4 h; 且只需掌握基本的植物形态方面知识, 完成植物材料分割, 按照实验操作步骤, 稍加练习, 即可上手。蔗糖保护法冰冻切片需要进行固定和蔗糖逐级替代细胞内水分, 然后才能包埋和切片, 需 12 h 以上; 蔗糖保护法除需要掌握基本的植物形态方面的知识, 还需要溶液置换和渗透方面的知识, 并需根据具体的植物材料选择适合的蔗糖浓度。石蜡切片过程需要固定、脱水、透明、透蜡、包埋、修蜡块、切片、烘片、染色和封片等步骤, 耗时长, 至少 5 ~ 7 d, 且程序繁琐; 石蜡切片技术对植物解剖学理论和实验操作要求较高, 在某一步骤上的失误都会导致整个实验失败, 技术较难掌握。

从切片的组织完整性和图片清晰度来比较, 石蜡切片的效果最好, 蔗糖保护法冰冻切片次之, 直接包埋法冰冻切片最差。在石蜡切片过程中, 植物材料经过固定、脱水、透明和浸蜡处理后, 植物细胞被石蜡填充, 细胞的形态和结构固定, 切片中细胞的完整性能很好保持, 经过透明和衬染后, 图片的清晰度和对比度都会很好 (见图版 - 1 ~ 4)。在蔗糖保护法冰冻切片过程中, 植物材料只经过固定和蔗糖替代部分胞内水分, 细胞结构和形态较固定, 但材料还是会有冰晶产生且材料和 OCT 包埋胶是不同介质, 硬度也不同, 切片中组织难免会有损伤, 如块根的皮肤有分离 (见图版 - 5)。直接包埋的植物材料中含水量较高, 冰冻后硬度大, 易产生冰晶, 在切片过程中易损伤组织结构, 切片的完整性不好, 如木薯叶片褶皱、破裂 (见图版 - 11), 叶柄的形成层区开裂和导管破损 (见图版 - 12)。

从植物材料的真实性和后续实验应用来比较, 冰冻切片没有经过有机溶剂处理和多次洗脱, 能够充分反映植物组织的真实性, 如木薯块根 (见图版 - 5) 和茎 (见图版 - 6) 中含有淀粉和代谢产物, 而在石蜡切片中已被溶解或洗脱, 在图片中很难看见 (见图版 - 1, 2)。与直接包埋法相比, 用蔗糖 - 磷酸缓冲液只替代细胞内水分, 会相应增加细胞的含糖量和磷酸盐浓度, 但蔗糖浓度过大会导致质壁分离。在合适的蔗糖浓度下, 冰冻切片的细胞显微结构和组织完整性都能很好保持, 可以应用于后续的组织化学染色和免疫荧光定位等实验。虽然直接包埋材料的冰冻切片不经过任何处理, 理论上切片中的细胞显微结构是最真实的, 但直接包埋的植物材料中含水量较高, 冰冻以后硬度大, 易产生冰晶, 在切片过程中易损伤组

织结构,切片的完整性不好,对后续实验作用不大。

2.3 木薯器官的冰冻切片 蔗糖保护法用于木薯不同器官的冰冻切片,真实的反映了细胞的显微结构,且切片组织完整性和图片清晰度效果良好(见图版-5~8)。

木薯块根的表皮和周皮由多层形状和大小相似的细胞紧密排列而成,呈棕褐色,易剥脱。皮层外侧多层细胞环装排列且有很多单宁、晶体等次生代谢产物聚集,呈褐色或褐色晶体;内侧薄壁细胞中有淀粉粒产生。形成层区较脆弱,皮层和中柱易分开。中柱内有大量单晶淀粉粒,呈贝壳形或扇形,在切片中呈游离状态(见图版-5)。中柱的中央有1条白色线状纤维,性质坚韧,即使块根被折断仍可相连。

木薯须根结构与主根类似,但发育尚未完全,中柱占横切片面的比例较小,且皮层外侧只有1层含有单宁、晶体的细胞围成环状,皮层和中柱细胞中只有少量淀粉粒,形成层区细胞只有2~3层,不明显(见图版-13~14)。

木薯叶片由表皮、叶肉和叶脉3部分组成(见图版-7),上、下表皮各有一层细胞,上表皮扁平,下表皮呈波浪状。叶肉的栅栏组织细胞细长且排列紧密,海绵组织排列稀疏,二者占叶肉厚度比例约为2:1。木薯光合效率高,与木薯叶片中存在类似C<sub>4</sub>植物叶片的维管束鞘细胞结构<sup>[4]</sup>有关,通过冰冻切片也能够观察到(见图版-15)。

叶柄表皮有1层细胞,排列紧密,有角质层。表皮内侧、皮层内侧和维管束附近的细胞中均有很多单宁、晶体,环状排列较紧密。维管束鞘细胞1~2层,细胞壁加厚;8个维管束对生,导管中有褐色物质沉积,周围有少量淀粉粒。髓部细胞大而蓬松,有少量晶体(见图版-8)。

木薯茎表皮和周皮由多层形状和大小相似的细胞紧密排列而成,呈棕褐色;皮层外侧也有几层含有单宁、晶体等次生代谢产物细胞,含量相对较少;皮层内侧有几层厚角细胞紧密排列的纤维层,将皮层和韧皮部隔开(见图版-6)。韧皮部和木质部的薄壁细胞中都有少量淀粉粒,髓部蓬松或中空。

### 3 讨论

与常规的石蜡切片相比,冰冻切片不经脱水、透明、浸蜡等步骤,因此,组织不会收缩<sup>[22]</sup>,可以对幼嫩组织和肉质组织进行切片,且具有能保存细胞内水溶性和脂溶性内含物等特点,在动物和人体中应用广泛<sup>[6-8]</sup>。新鲜材料不经处理,直接包埋冷冻切片的方法在动物和人体组织中经常被采用且效果良好。但在植物组织中,未经固定的材料直接包埋冷冻切片的效果差<sup>[13,18]</sup>,难以得到结构完整的切片;而采用直接包埋和适当回温相结合的方法,取得了较好的切片效果<sup>[17]</sup>,但过程较复杂,对熟练程度和操作性要求较高,不适于初学者。植物细胞具有细胞壁和液泡,其细胞的含水量远大于动物和人体细胞的含水量,所以在冰冻后植物组织硬度大且容易产生冰晶,难以切出结构完整的植物组织切片,冷冻保护剂可以置换出细胞内的部分水分,降低细胞溶液的冰点,从而降低冰晶的产生,获得薄且结构完整的切片<sup>[12-13,17,19]</sup>。很多研究人员还提出用冷冻保护和快速冰冻相结合的方法来进行冰冻切片,但使用液氮或干冰进行快速冷冻,植物组织在快速冷冻和升温过程中会发生结构破坏<sup>[18-19]</sup>且细胞的成活率大幅度降低<sup>[9-10]</sup>,如果要观察细胞的超微结构,在冰冻切片时建议避免使用液氮或干冰速冻处理<sup>[21]</sup>。

综上所述,冰冻切片是植物细胞和形态结构研究的一种简便、快捷、高效的方法,笔者使用蔗糖保护法对木薯不同器官进行冰冻切片,取得了良好的效果。本研究旨在促进植物冰冻切片技术的在热带作物研究中应用和推广。

### 参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [2] 周凤珏, 许鸿源, 白坤栋, 等. PP333对木薯生长、光合和蒸腾的影响[J]. 中国农学通报, 2004, 20(1): 17-20.
- [3] TAYLOR N, CHAVARRIAGA P, RAEMAKERS K, et al. Development and application of transgenic technologies in cassava [J]. Plant Mol. Biol., 2004, 56(4): 671-688.
- [4] 张杨, 卢诚, 王文泉. 木薯栽培种与野生种叶片光合器官结构和酶学差异[J]. 中国农学通报, 2012, 28(25): 144-149.
- [5] 陈生斗. 木薯产业发展前景广阔[J]. 中国热带农业, 2006(5): 1.

- [6] DIETLEIN T S , JACOBI P C , FRIE C , et al. Immunohistochemical distribution of type VI collagen in normal and glaucomatous human trabecular meshwork [J]. Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophth. Halmol. ,1998 ,236 ( 8) : 597 – 601.
- [7] NEWTON S S , DOW A , TERWILLIGER R , et al. A simplified method for combined immune histochemistry and *in-situ* hybridization in fresh-frozen , cryocut mouse brain sections [J]. Brain Research Protocols ,2002 ,9( 3) : 214 – 219.
- [8] LIN J C , CHIANG C F , WANG S W , et al. Significance of expression of human METCAM/MUC18 in nasopharyngeal carcinomas and metastatic lesions [J]. Asian Pac. J. Cancer Prev. ,2014 ,15 ( 1) : 245 – 252.
- [9] WITHERS L A , DAVEY M R. A fine-structure study of the freeze-preservation of plant tissue culture , I . The frozen state [J]. Protoplasma ,1978 ,94: 207 – 219.
- [10] 孙龙华 简令成. 红豆草组织培养物的超低温保存及其超微结构的观察 [J]. 植物学报 ,1990 ,32( 4) : 262 – 267.
- [11] CONLEY C A , HANSON M R. Tissue-specific protein expression in plant mitochondria [J]. Plant Cell ,1994 ,6( 1) : 85 – 91.
- [12] 贺新强 李素文 胡玉熹 等. 毛竹细胞壁自发荧光的显微荧光分光光度分析 [J]. 植物学报 ,1999 ,41: 711 – 714.
- [13] 林月惠 李寒冰 贺新强. 高度木质化材料的冰冻切片技术 [J]. 植物学通报 2001( 18) : 118 – 120.
- [14] 陈丹 赵洁. 适合于植物花器官的冰冻切片技术 [J]. 武汉植物学研究 2005 ,23( 3) : 285 – 290.
- [15] 刘剑锋 程云清 阎秀峰 等. 植物冰冻切片技术的改进 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版 2006 ,30( 3) : 128 – 130.
- [16] 刘剑锋 阎秀峰 程云清 等. 冰冻切片技术在高山红景天细胞学研究中的应用 [J]. 东北林业大学学报 2006 ,34( 4) : 110 ,119.
- [17] 张新成 李志刚 李素丽 等. 冰冻切片法在植物微管骨架研究中的应用 [J]. 广西植物 2008 ,28( 2) : 164 – 166.
- [18] 宁代锋 尹增芳 张菁 等. 一种简单快速植物组织冰冻切片方法 [J]. 热带亚热带植物学报 2008 ,16( 4) : 386 – 389.
- [19] 陆叶 席梦利 郑佳 等. 杨树和杉木茎段组织的冰冻切片技术研究 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版 2009 ,33( 6) : 44 – 48.
- [20] 李贺 刘松梅 孙艳 等. 冰冻切片技术在海滨锦葵细胞学研究中的应用 [J]. 广西植物 2010 ,30( 2) : 170 – 173.
- [21] 李儒海 强胜. 杂草果实的冰冻切片技术 [J]. 植物学报 2010 ,45( 6) : 739 – 743.
- [22] 李建霞 张出兰 夏晓飞 等. 植物冰冻切片条件的优化及其与石蜡切片在组织化学应用中的比较 [J]. 植物学报 , 2013 ,48( 6) : 643 – 650.

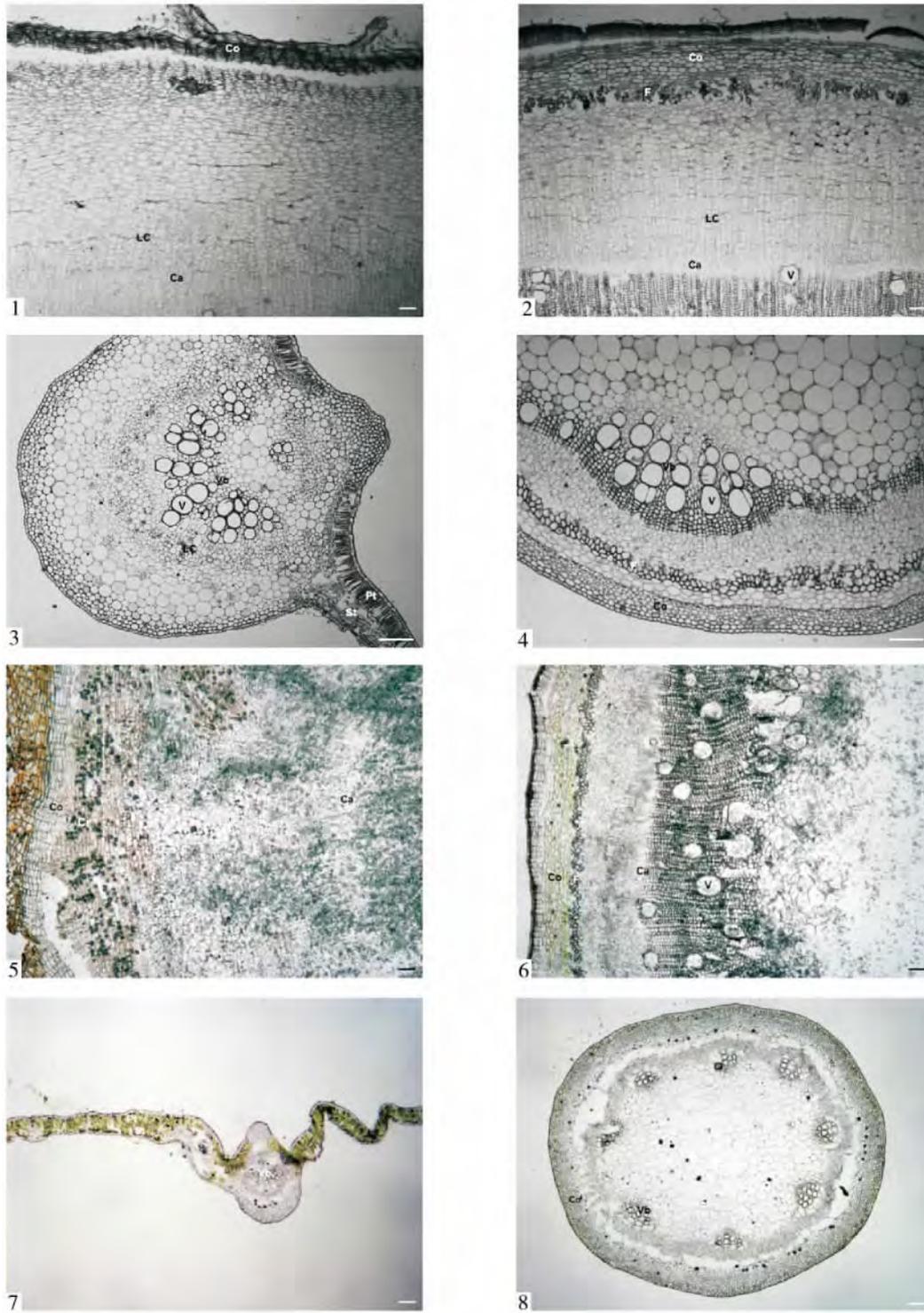
## A Cryo-sectioning Method Used for Micro-structural Observation of *Manihot esculenta* Crantz.

LIU Xuehui<sup>1</sup> , ZHANG Shixin<sup>1 2</sup> , YANG Peng<sup>1 2</sup> , TIAN Weimin<sup>2</sup>

( 1. Hainan University , Haikou 570228 , China; 2. Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree , Ministry of Agriculture/State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation and Physiology of Tropical Crops , Rubber Research Institute , CATAS , Danzhou 571737 , China)

**Abstract:** Cryo-sectioning , a fast and easy technique , is used to section delicate tissue and fleshy tissue and preserve cells within water-soluble and lipid-soluble inclusions and other features without dehydration and transparency , and has been widely used in animal and human studies , but seldom applied in plants. The roots , stems and leaves of cassava ( *Manihot esculenta* Crantz. ) were sectioned by using direct embedding cryosectioning , sucrose cryoprotectant cryosectioning and paraffin sectioning and observed and photographed under microscope. The results showed that the microstructures of the roots , stems and leaves of cassava sectioned by using the sucrose cryoprotectant cryosectioning were observed vivid to the true with better structural integrity and images of the sectioned tissues than those from the other two sectioning methods.

**Key words:** *Manihot esculenta*; cryo-sectioning; paraffin sectioning; microstructure

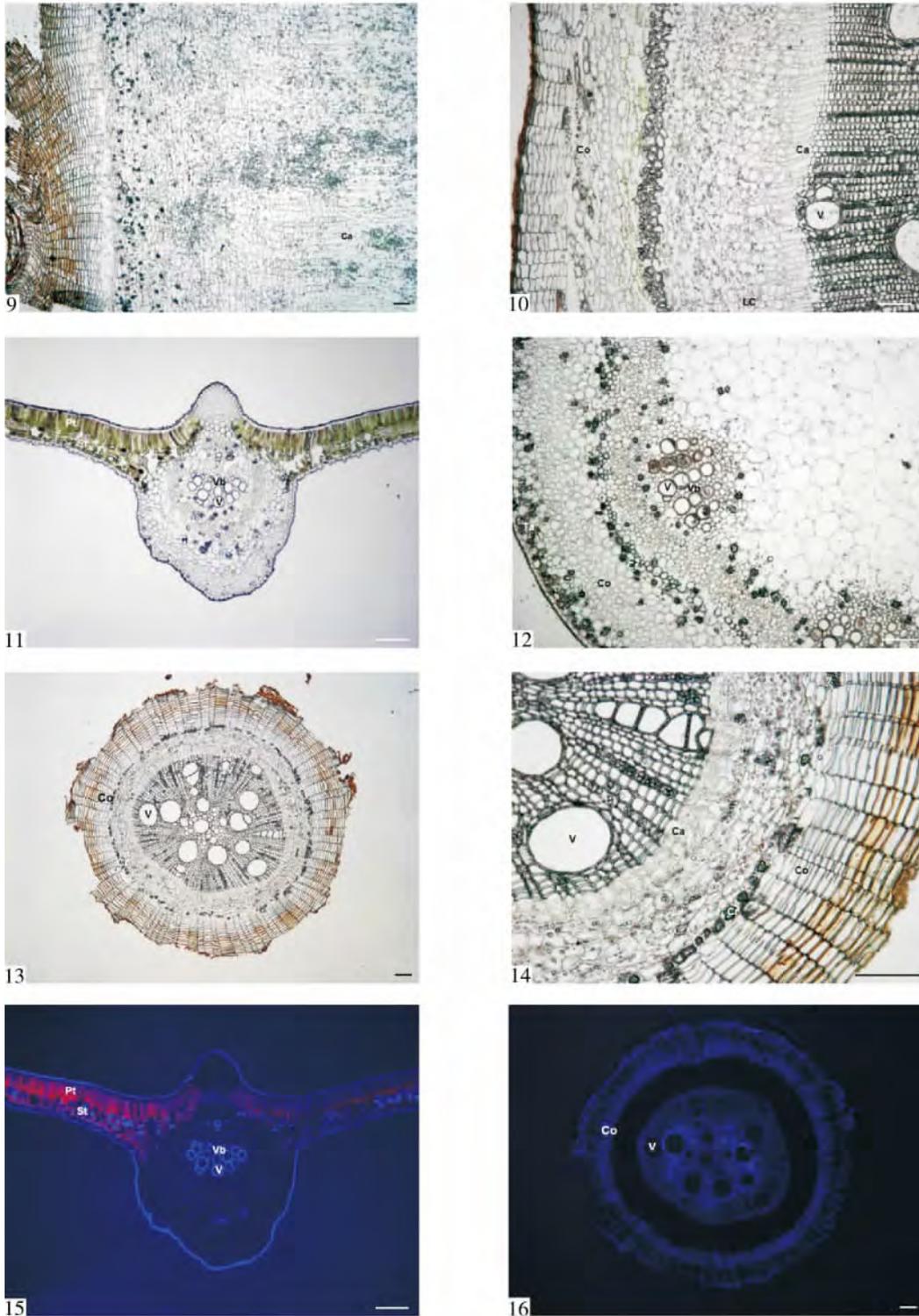


图版 木薯根、茎和叶的横切图

图版说明: 石蜡切片: 1 为块根(5×); 2 为茎(5×); 3 为叶片(5×); 4 为叶柄(10×)。直接包埋法冰冻切片: 5 为块根(5×); 6 为茎(5×); 7 为叶片(5×); 8 为叶柄(5×)

Plates: Partially magnifying sections of the root, stem and leaf of *Manihot esculenta*

Legends: Paraffin section: 1: Root (5×); 2: Stem (5×); 3: Leaf (10×); 4: Petiole (10×). Direct embedding cryo-section: 5: Root (5×); 6: Stem (5×); 7: Leaf (5×); 8: Petiole (5×)



续图版 木薯根、茎和叶的横切图

图版说明: 蔗糖保护法冰冻切片 9 为块根(5×); 10 为茎(5×); 11 为叶片(10×); 12 为块根(5×); 13 为须根(5×); 14 为块根(20×); 15 为叶片自发荧光(与 12 对应 5×); 16 为须根自发荧光(与 13 对应 20×)。Ca: 形成层, Co: 皮层, F: 纤维, LC: 乳汁细胞, V: 导管, Vb: 维管束, Cr: 晶体, S: 石细胞, Pt: 栅栏组织, St: 海绵组织, Ta: 单宁。标尺: 100 μm

Plates: Partially magnifying sections of the root, stem and leaf of *Manihot esculenta*

Legends: Paraffin section: Sucrose protectant cryo-section: 9: Root (5×); 10: Stem (5×); 11: Leaf (10×); 12: Petiole (5×); 13: Fibre (5×); 14: Root (20×); 15: Autofluorescence of leaf (with 12, 5×); 16: Autofluorescence of fibre (with 13, 20×). Ca: Vascular cambium; Co: Cortex; F: Fiber; LC: Laticiferous cell; V: Vessel; Vb: Vascular bundle; Cr: Crystal; S: Stone cell; Pt: Palisade tissue; St: Spongy tissue; Ta: Tannin; Bar = 100 μm