

四倍体刺槐茎段组织石蜡切片的制作方法

权金娥, 朱海兰, 张春霞, 张 胜, 赵 忠*

(西北农林科技大学 西部环境与生态教育部重点实验室, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:以传统石蜡切片方法为基础,针对林木茎段木质化程度高、硬度和脆性大的特点对固定、软化、脱水、透明、染色等具体步骤进行了改进,并成功应用于四倍体刺槐生根过程插穗基部解剖学研究。结果表明:较传统方法切片时组织不易碎,切片结构完整,减少了脱水时间,缩短了制片周期;获得了厚度为 8 μm 且染色清晰、细胞结构完整的林木茎段横切面切片;四倍体刺槐插穗石蜡切片可清晰的观察大量能够反映生根各时期发育特征。该方法为进一步从解剖学上研究林木茎段组织生长机制提供基础,为探究其组织形态变化提供了新的技术方法。

关键词:四倍体刺槐;林木茎段;石蜡切片;制作方法

中图分类号:S792.27

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2014)03-0140-05

Preparation of Paraffin Section of Tetraploid *Robinia pseudoacacia* Stem Segment Tissue

QUAN Jin-e, ZHU Hai-lan, ZHANG Chun-xia, ZHANG Sheng, ZHAO Zhong*

(Key Laboratory of Environment and Ecology in Western China of Ministry of Education,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Traditional method of making paraffin section was modified from the aspects of fixing, softening, dehydration, transparency, dyeing and other steps to fit the hard, crisp and highly lignified woody stem segment. This modified method was successfully applied to observe the rooting process of cuttings of *Robinia pseudoacacia* tetraploid. We made a 8 μm cross-section slice with clearly staining and complete organizational structure. The method reported in this study would provide theoretical and technical basis for anatomical observation to study the growing mechanism of woody plants as well as for identification of histomorphology changes.

Key words: tetraploid *Robinia pseudoacacia*; woody stem segment; paraffin section; preparation method

石蜡切片是组织解剖学研究中应用最为经典的试验方法,也是观察及判断细胞、组织和器官的形态变化规律的有效手段^[1]。它具有易操作、成本低、切片薄、且能连续切片、可永久保存等优点。石蜡切片技术被广泛的用于植物解剖学和组织形态发育特征研究,揭示植物组织发育规律中起着重要的作用^[2-4]。该方法已被应用到林木结构组织发育方面^[5-7]和林木无性繁殖插条不定根发育过程的解剖学形态变化研究^[8-12]。目前,利用石蜡切片技术研究杉木(*Cunninghamia lanceolata*)^[13]、华北五角枫

(*Acer truncatum*)^[14]、玫瑰(*Rosa rugosa*)^[15]等,这些都是传统的石蜡切片技术。但毛晓霞^[16]利用传统的石蜡切片方法研究小蜡(*Ligustrum sinense*)叶片主脉发现石蜡切片制作过程复杂,制作周期长,组织块易破碎,切片皱褶多等。以四倍体刺槐茎段组织为研究材料,由于其茎段组织木质化、纤维化程度高,材料硬度和脆性大结构特点,使得石蜡切片制作难度较大,按传统的石蜡切片方法很难获得完整、清晰的显微切片。本研究对传统石蜡切片技术用于四倍体刺槐茎段的不适宜步骤进行改良,以建立适合

收稿日期:2013-09-04 修回日期:2013-12-16

基金项目:国家自然科学基金项目“四倍体刺槐生根调控机理研究”(30972352)。

作者简介:权金娥,女,在读博士,研究方向:森林培育理论与技术。E-mail: quanjine@gmail.com

* 通信作者:赵忠,男,教授,博士生导师,研究方向:森林培育理论与技术。E-mail: zhaozh@nswsuaf.edu.cn

四倍体刺槐茎段组织的石蜡制片方法。为进一步从解剖学上研究木质化程度高的林木茎段组织的生长机制、探究其微观形态结构以及物种鉴别提供试验技术方法和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

在西北农林科技大学试验苗圃四倍体刺槐采穗圃采集母树为 3 年生萌生的 1 年生硬枝插条,扦插于科研温室苗床,根据插穗的发育过程连续采样,采得不同发育时期的插穗。

1.2 方法

1.2.1 取材与固定 从苗床随机采取不同发育时期插穗,剪取插穗基部 2 cm(去除生根过程中基部产生的愈伤组织),将插穗基部 2 cm 再横切成 0.5 cm 小段;材料按下列 3 种不同处理方式固定:传统处理方法 1:将材料快速置于 70%的乙醇中,4℃长期保存;传统处理方法 2:材料放入传统 FAA 固定液(70%乙醇 90 mL、冰醋酸 5 mL、甲醛 5 mL),4℃下保存 24 h^[1];改进处理方法 3:材料放入改良的 FAA 固定液中(70%乙醇 85 mL、冰醋酸 5 mL、甲醛 5 mL、甘油 5 mL),立即抽真空至茎段组织下沉为止,4℃下保存至少 48 h,每处理重复 3 次。

1.2.2 软化 将固定好的材料用蒸馏水冲洗 5 min,然后将材料分别置入 3 种不同处理软化剂中:传统处理方法 1、不经任何软化处理的材料作为对照;传统处理方法 2、将材料浸入 50%乙醇:50%甘油(1:1)混合液中 7 d^[17],立即抽真空;改进处理方法 3、将材料浸入 50%乙醇:70%甘油(1:1)混合液中 7 d,迅速抽真空,每处理重复 3 次。

1.2.3 脱水与透明 采用乙醇梯度脱水法,即 50%乙醇 1.5 h(重复 1 次),75%乙醇 1.5 h,85%乙醇 1.5 h,95%乙醇 1 h,无水乙醇 45 min(Ⅰ),无水乙醇 45 min(Ⅱ),试验基于传统的操作步骤,在替换脱水剂后立即抽真空。将茎段移入 3:1 的无水乙醇与二甲苯混合液中 30 min,1:1 的无水乙醇与二甲苯混合液中 30 min,无水乙醇与二甲苯 1:3 的混合液中 30 min,二甲苯 20 min(Ⅰ),二甲苯 20 min(Ⅱ)。

1.2.4 透蜡与包埋 将二甲苯:石蜡为 1:1 溶液放入 37~40℃恒温箱中过渡浸蜡 48~72 h 后,换纯石蜡于 60~63℃恒温箱中浸蜡,期间换 3 次纯石蜡,透蜡后用 2 cm×2 cm×3 cm 的牛皮纸盒进行包埋。

1.2.5 切片 将蜡块修成梯形,粘在小木块上,把小木块装在切片机上切片,厚度为 8 μm。

1.2.6 粘片与烤片 在清洁的载玻片上涂一薄层赫伯特粘贴剂(明胶 1 g+蒸馏水 100 mL+甘油 15 mL+石碳酸 2 g),加 1~2 滴蒸馏水,将蜡片光亮平整的一面贴于载玻片上,然后将载玻片置于预先加热的展片台(温度保持在 38~39℃)上使蜡片展开,最后把载玻片置于 37℃温箱烘 24~48 h。

1.2.7 染色与脱蜡 1%番红溶液染色 80 min→85%乙醇 5 min→95%乙醇 5 min→1%固绿复染 5 s→95%乙醇 5 min→无水乙醇 5 min(Ⅰ)→无水乙醇 5 min(Ⅱ)→无水乙醇:二甲苯为 2:1 溶液中 5 min→无水乙醇:二甲苯为 1:1 溶液中→无水乙醇:二甲苯为 1:2 溶液中 5 min→二甲苯 25 min(Ⅰ)→二甲苯 10 min(Ⅱ)。

1.2.8 封片 将泡在二甲苯中切片取出之后,加 1 滴中性树胶,取干净的盖玻片从胶一侧放下,放在通风橱里充分脱苯。

1.2.9 镜检和拍照 光学显微镜下观察并记录,Olympus 显微摄影装置下显微拍照。

2 结果与分析

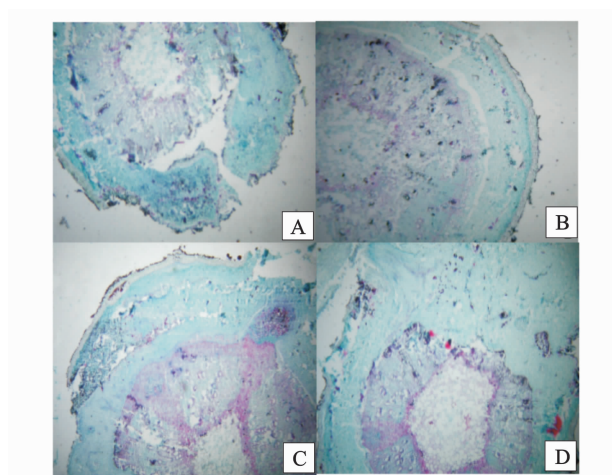
2.1 固定剂改进

从表 1 中可以看出,传统处理方法 1 的效果最差(图 1-A、B、C、D),切片时不能形成蜡带,材料易发生破损,可能材料经脱水透明后硬度明显增大,同时,染色后很难观察到组织细胞,可能是因为 70%乙醇固定液易破坏材料的完整性。传统处理方法 2 的切片效果较差(图 2-E、F、G、H)。其原因在于固定液添加甘油来进行预软化处理,较效果不够,不能获得硬度适中的组织。改进处理方法 3 切片效果好,较长时间的固定易获得的硬度适中,结构完整的切片(图 3-a、b、c、d),改进处理方法 3 固定效果较好得到的四倍体刺槐茎段组织切片表皮完整,细胞无萎缩变形,细胞清晰,染色较好,使组织不容易变形。

表 1 不同固定方式对切片效果的影响

Table 1 Effect of paraffin section on different types of fixation

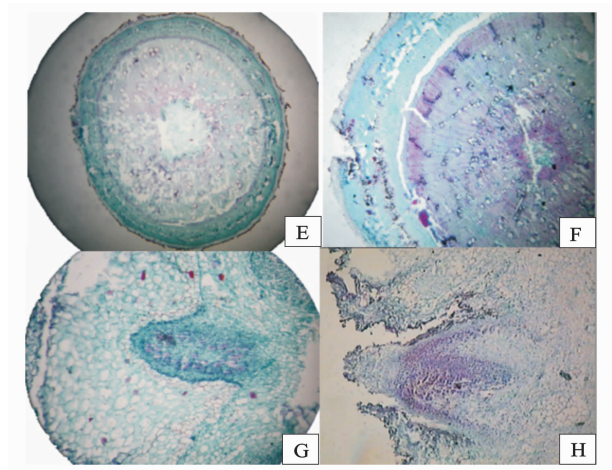
固定处理	蜡带	皮层	薄壁细胞	髓层	横切面	图片
传统处理方法 1	分离,易碎,空洞	破裂且不完整	不清晰,数量少	遗失	不完整,轮廓不清晰	图版 I
传统处理方法 2	有横纹,易弯曲	不完整	不清晰,数量少	不完整	不完整,轮廓不清晰	图版 II
改进处理方法 3	切片良好	完整	清晰,数量多	完整	完整,轮廓清晰	图版 III



A. 扦插前插穗的横切面(30×);B. 扦插 5 d 后出现愈伤组织插穗的横切面(30×);C. 扦插 25 d 后出现在髓射线与皮层交界处的根原基的插穗横切面(30×);D. 扦插 30 d 后不定根伸出皮层外插穗的横切面(40×)。

图 1 传统石蜡切片法 1 的四倍体刺槐茎段不定根发育图

Fig. 1 Tetraploid *R. pseudoacacia* stem segment tissue adventitious root developmental anatomy of the traditional paraffin sections method 1



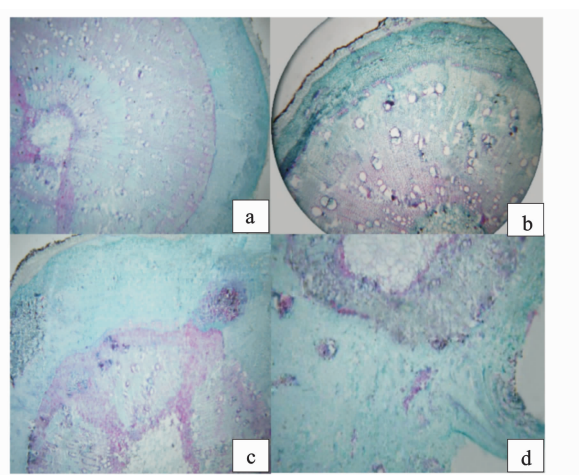
E. 扦插前插穗的横切面(30×);F. 扦插 5 d 后出现愈伤组织插穗的横切面(30×);G. 扦插 25 d 后出现在髓射线与皮层交界处的根原基的插穗横切面(40×);H. 扦插 30 d 后不定根伸出皮层外插穗的横切面(40×)。

图 2 传统石蜡切片法 2 的四倍体刺槐茎段不定根发育图

Fig. 2 Tetraploid *R. pseudoacacia* stem segment tissue adventitious root developmental anatomy of the traditional paraffin sections method 2

2.2 软化剂确定

3 种处理方式(表 2)中,改进处理方法 3 采用了



a. 扦插前插穗的横切面(30×);b. 扦插 5 d 后出现愈伤组织插穗的横切面(30×);c. 扦插 25 d 后出现在髓射线与皮层交界处的根原基的插穗横切面(40×);d. 扦插 30 d 后不定根伸出皮层外插穗的横切面(40×)。

图 3 改进石蜡切片法的四倍体刺槐茎段不定根发育图

Fig. 3 Tetraploid *R. pseudoacacia* stem segment tissue adventitious root developmental anatomy of the improved paraffin sections method

不同浓度的软化剂均达到切片组织结构最完整,细胞最清晰使得木质化程度较高的茎段组织硬度适中,切片时组织不易碎,切片组织结构完整,即可获得清晰的石蜡切片(图 3-a、b、c、d)。传统处理方法 1 获得的蜡带效果最差,且其皮层易破裂、内部结构不完整(图 1-A、B、C、D)。传统方法 2 获得的蜡带效果较差,且其皮层易破裂、但内部结构比较完整(图 2-E、F、G、H)。

2.3 样品脱水时间的改良

将每级梯度乙醇脱水时间在传统方法 2~3 h 的基础缩短为 1.0~1.5 h。具体步骤为 50%乙醇 I→50%乙醇 II→70%乙醇→85%乙醇→95%乙醇→无水乙醇(I)→无水乙醇(II),每级 90 min,其中,95%乙醇 1 h,无水乙醇 45 min。

2.4 最佳透明时间选择

结合四倍体刺槐茎段组织木质化硬度高的特点,脱水后经过二甲苯以过渡,为了避免材料收缩,材料从纯乙醇到二甲苯须采取逐渐置换的步骤。具体步骤为:2/3 无水乙醇+1/3 二甲苯→1/2 无水乙醇+1/2 二甲苯→1/3 无水乙醇+2/3 二甲苯→二甲苯(I)→二甲苯(II),每级 30 min,其中,纯二甲苯 20 min。

表 2 不同软化方式对切片效果的影响

Table 2 Effect of paraffin section on different types of inteneration

软化处理	蜡带	皮层	薄壁细胞	髓层	横切面	图片
传统处理方法 1	分离,易碎,空洞	破裂且不完整	不清晰,数量少	遗失	不完整,轮廓不清晰	图版 I
传统处理方法 2	有横纹,易弯曲	不完整	清晰,数量多	完整	完整,轮廓不清晰	图版 II
改进处理方法 3	切片良好	完整	清晰,数量多	完整	完整,轮廓清晰	图版 III

2.5 染色程序简化及最佳染色时间确定

本步骤番红染色时间由传统的24 h改进为80 min,即1%番红溶液(1 g 番红溶于50%乙醇100 mL)染色80 min→50%乙醇5 min→70%乙醇5 min→85%乙醇5 min→95%乙醇5 min→1%固绿(1 g 固绿溶于95%乙醇100 mL中)复染5 s。结合石蜡切片较薄和林木茎段易上色的特点,同时还适当缩短番红染色时间,避免番红着色过深,保证番红-固绿二重染色效果清晰。

2.6 固定、软化和脱水后抽真空

在固定、软化及替换脱水剂后不进行抽真空为对照,结果表明,分别在固定、软化和脱水后添加抽真空步骤,制作的切片效果更好。

2.7 制片效果

石蜡切片中植物组织形态和结构是否完整,细胞是否清晰是判断切片质量的主要指标。传统石蜡切片方法直接包埋四倍体刺槐茎段的切片较为困难,大多数切片呈破碎和空洞状。显微镜下观察切片,可见组织多处分离,切片效果较差(图1-A、B、C、D和图2-E、F、G、H),切片表现为组织弯曲易碎,切片结构不完整,蜡带分离和轮廓不清晰。改进后的石蜡切片方法相比传统制片方法(图3-a、b、c、d)容易制片,获得了高质量的石蜡切片,染色清晰、组织结构完整、细胞轮廓清晰,并以此方法制作了四倍体刺槐的扦插后不定根发育过程的横切图片。

3 结论与讨论

目前国内有关四倍体刺槐不定根发育过程中插穗茎段形态解剖学观察研究中常用的石蜡切片技术未见成功的报道。本研究结合四倍体刺槐茎段的结构特点,对传统石蜡切片技术进行有针对性的改良,探索得到了适合四倍体刺槐茎段的石蜡切片方法。

四倍体刺槐茎段的最外2层为表皮和皮层,皮层之内为数层厚壁的韧皮部(即硬化的薄壁组织),硬化薄壁组织之内为木质部、木质部之内分布着中心髓和髓射线。木质部的木质化和纤维化程度高、硬度大,髓和髓射线内部细胞疏松、组织较软。针对四倍体刺槐插穗茎段的这种结构特性,利用传统的石蜡切片方法根本无法得到组织结构完整的石蜡切片。因此,该研究在传统石蜡切片的基础上对固定、软化、脱水、透明、染色等具体步骤进行改良。四倍体刺槐不定根发育过程中茎段石蜡切片过程并不复杂,但每一个操作步骤都至关重要,要制出高质量的切片,必须对过程中关键环节予以重视。

固定 对于硬度大的植物在制作石蜡切片时在固定步骤之后用甘油来软化^[18],本研究在固定液里面添加甘油,同时进行固定和预软化,目前未见报道。在FAA固定液中加入适当的甘油软化剂可以

使高度木质化的四倍体刺槐茎段组织不会过度硬化。材料放入改良后的FAA固定液中后,并且立即抽真空直至茎段组织下沉为止,这样使材料完整性保持良好。

软化 由于FAA固定液中的甲醛会增强四倍体刺槐茎段组织脆度和硬度,因此,软化这一步骤可以使四倍体刺槐茎段组织脆度和硬度降低,切片时组织不易碎,切片组织结构完整。此外,材料放入改良后的FAA固定液中后,立即抽真空直至茎段组织下沉为止,附加此步骤不仅可在抽真空时保持结构的完整,还可使软化液迅速渗入材料内,起良好的软化效果。

脱水 四倍体刺槐茎段皮层结构致密、高度木质化,水分含量低,薄壁细胞构成的基本组织水分含量高,但细胞壁薄,水分易被置换。在脱水过程中组织块在高浓度乙醇中放置时间又不宜过长,否则组织过度硬化。时间也不宜过短,否则经常出现的问题包括脱水不彻底和过度硬化现象,水与二甲苯、石蜡不能互溶,组织脱水不彻底时二甲苯不能渗入,组织也无法透明,包埋好的蜡块出现凹陷,或组织与蜡分离。因此,脱水时要根据不同材料的组织结构特征确定合适的脱水时间,避免组织脱水不彻底或过度硬化。本研究将每级梯度乙醇脱水时间缩短为90 min。是基于四倍体刺槐茎段皮层结构致密、高度木质化,水分含量低,薄壁细胞构成的基本组织水分含量高但细胞壁薄,水分易被置换在脱水过程中经常出现的问题包括脱水不彻底和过度硬化现象。水与二甲苯、石蜡不能互溶。组织脱水不彻底时二甲苯不能渗入,组织也无法透明,显现浑浊。石蜡亦不能渗入组织,包埋好的蜡块与空气接触后也会因水分蒸发而凹陷,或组织与蜡分离。而组织块在高浓度乙醇中放置时间又不宜过长,否则组织过度硬化。因此,脱水时要根据不同材料的组织结构特征确定合适的脱水时间,避免组织脱水不彻底或过度硬化,导致切片质量下降乃至失败。并且,在替换脱水剂后,进行短时间抽真空,增加此一步骤不仅可以除去附在皮孔间的空气,还可以通过改变内外压力,加速脱水剂的渗入,缩短脱水时间。一般抽真空3~5 min,不易过长,否则结构会变形。

透明 为使茎段皮层致密的厚壁细胞透明完全,要求掌握好时间,根据材料组织块的大小,适宜调整时间;透明不完全,石蜡无法渗入组织;透明时间不宜过长,否则会造成材料脆性增大,组织易碎,制成空洞蜡片^[19]。研究表明要以组织呈现透明状为宜,根据材料组织块的大小,适宜调整时间;透明不完全,石蜡无法渗入组织,透明时间过长,组织会变脆变硬。

染色 染色过程中容易出现的问题是切片染色对比不清晰和容易脱片。染色对比不清晰的原因,

一是固绿染色太深;二是番红染色不足或过深。需通过不同染色时间梯度来选择出最佳染色时间。染色过程中出现脱片是由于组织切片在染色的系列溶液中浸泡时间较长或贴片不好造成的。结合石蜡切片较薄以及四倍体刺槐的茎段木质化、纤维化程度高的特点,适当缩短脱蜡、梯度乙醇复水、番红染色时间,降低脱片率。由于四倍体刺槐茎段石蜡切片较薄,适当缩短脱蜡时间可以保证脱蜡完全;四倍体刺槐的茎段木质化程度高,番红染色着色较快,可以适当缩短番红染色时间,避免番红着色过深,保证番红-固绿的颜色对比清晰。

试验基于常规的操作步骤,分别在材料固定、软化及替换脱水剂后适当地进行抽真空。附加步骤不仅可在抽真空时保持结构的完整,还可以使固定液和软化液迅速渗入材料内,从而起到良好的固定和软化效果^[20]。在替换脱水剂后,进行短时间抽真空,不仅可以除去附在皮孔间的空气,还可以通过改变内外压力,加速脱水剂的渗入,缩短脱水时间。一般抽真空 3~5 min,不易过长,否则结构会变形。本研究通过对石蜡切片过程中固定、软化、脱水、透明、染色过程的优化改良,容易得到高质量的石蜡制片,获得染色清晰、组织结构完整的四倍体刺槐不定根发育过程中基部茎段横切图片,切片厚度在 8 μm ,与植物显微结构观察要求的厚度一致。石蜡切片不易过厚,切片过厚使多层细胞组织重叠,不易看清组织结构。

林木茎段石蜡切片的制作过程并不复杂,但影响切片质量的因素是多方面的,要制出高质量的切片,每个操作步骤都至关重要。制备高水平的石蜡切片需要在现有的条件下根据实际操作需要不断地摸索与探讨,总结经验与完善。

参考文献:

- [1] 李正理. 植物制片技术[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [2] HENNIG G, GEHRMANN M, STROPP U, *et al.* Automated extraction of DNA and RNA from a single formalin-fixed paraffin-embedded tissue section for analysis of both single nucleotide polymorphisms and mRNA expression[J]. *Clinical Chemistry*, 2010, 56(12): 1845-1853.
- [3] TAKAHASHI H, KAMAKURA H, SATO Y, *et al.* A method for obtaining high quality RNA from paraffin sections of plant tissues by laser microdissection[J]. *Journal of Plant Research*, 2010, 123(6): 807-813.
- [4] 朱耀军. 牡丹茎扦插繁殖技术及生根机理初步研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2007.
- [5] 刘杏娥, 汪佑宏, 江泽慧, 等. 黄藤材发育过程中维管束的变化[J]. *西北林学院学报*, 2010, 25(2): 152-155.
LIU X E, WANG Y H, JIANG Z H, *et al.* Vascular bundle variation in the growth of *Daemonorops margaritae* [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2010, 25(2): 152-155. (in Chinese)
- [6] 杨茂生, 梅秀英, 姜在民, 等. 黄帝陵侧柏叶受污染状况的形态解剖学研究[J]. *西北林学院学报*, 1994, 9(3): 12-16.
YANG M S, MEI X Y, JIANG Z M, *et al.* The morphological and anatomical study on the states of polluted scale-shaped leaves of the *Platycladus orientalis* in Huangdiling [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 1994, 9(3): 12-16. (in Chinese)
- [7] 苏印泉, 张军侠. 10 种茶叶叶片比较解剖学及与抗性关系的研究[J]. *西北林学院学报*, 1998, 13(4): 1-8.
SU Y Q, ZHANG J X. A study on comparative anatomy and relationship with resistance of tea blades of 10 species [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 1998, 13(4): 1-8. (in Chinese)
- [8] RICCI A, ROLLI E, DRAMIS L, *et al.* N, N'-bis-(2, 3-Methylenedioxyphenyl) urea and N, N'-bis-(3, 4-methylenedioxyphenyl) urea enhance adventitious rooting in *Pinus radiata* and affect expression of genes induced during adventitious rooting in the presence of exogenous auxin [J]. *Plant Science*, 2008, 175(4): 356-363.
- [9] 段昌盛, 张守攻, 王军辉, 等. 3 种云杉嫩枝扦插生根特性的研究[J]. *西北林学院学报*, 2009, 24(6): 59-61.
DUAN C S, ZHANG S G, WANG J H, *et al.* Rooting capability of twigs of three spruce species [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2009, 24(6): 59-61. (in Chinese)
- [10] WANG X L, ZHAO Z, QUAN J E. Indole-3-butyric acid on rooting and endogenous plant hormones in tetraploid and diploid *Robinia pseudoacacia* hardwood cuttings [J]. *PHYTON*, 2011, 80: 93-100.
- [11] 王小玲, 赵忠, 权金娥, 等. 外源激素对四倍体刺槐硬枝扦插生根及其关联酶活性的影响[J]. *西北植物学报*, 2011, 31(6): 116-122.
WANG X L, ZHAO Z, QUAN J E, *et al.* Rooting and correlative enzyme activities of hardwood cuttings of tetraploid *Robinia pseudoacacia* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2011, 31(6): 116-122. (in Chinese)
- [12] 鲁丹, 张瑞, 彭方任, 等. 红桧木扦插繁殖技术及生根过程的解剖学观察[J]. *西南林业大学学报*, 2013, 33(2): 54-57.
LU D, ZHANG R, PENG F R, *et al.* Studies on cuttage propagation technique and anatomical observation on the rooting process of *Alnus rubra* cutting [J]. *Journal of Southwest Forestry University*, 2013, 33(2): 54-57. (in Chinese)
- [13] 马英, 李明鹤, 张新华, 等. 杉木嫩枝扦插不定根形成的解剖学研究[J]. *华中农业大学学报*, 1998, 17(1): 81-83.
MA Y, LI M H, ZHANG X H, *et al.* An anatomical study on the formation of adventitious roots of Chinese fir cutting [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1998, 17(1): 81-83. (in Chinese)
- [14] 牛田, 王厚新, 李承秀, 等. 华北五角枫嫩枝扦插生根形态解剖学分析[J]. *山东林业科技*, 2012(5): 19-21.
- [15] 王新刚. 玫瑰扦插生根解剖学及繁殖技术研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- [16] 毛晓霞. 石蜡切片制作方法的改良[J]. *安徽农学通报*, 2013, 19(8): 15-17.
- [17] 李素坤, 张秋芝, 郝玉兰, 等. 玉米成熟期茎秆石蜡切片方法的研究[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(8): 3935-3937.
- [18] BARBOSA A C F, PACE M R, WITOVISK L, *et al.* A new method to obtain good anatomical slides of heterogeneous plant parts [J]. *IAWA Journal*, 2010, 31(4): 373-383.
- [19] 姜维梅, 张冬青, 徐春霄. 油菜茎的解剖结构和倒伏关系的研究[J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2001, 27(4): 439-442.
JIANG W M, ZHANG D Q, XU C H. Studies on the stem anatomy of *Brassica oil* to lodging [J]. *Journal of Zhejiang University: Agric. & life Sci.*, 2001, 27(4): 439-442. (in Chinese)
- [20] 吴华, 陈娉婷, 袁玲, 等. 蕨类植物石蜡切片制作技术探讨[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(18): 3767-3769.