

麻栎 (*Quercus acutissima*) 高度木质化雌花石蜡显微制片的软化方法

史成成^{1,2}, 宁馨^{2,3}, 李颖², 曹建国¹ (1. 上海师范大学生命科学学院, 上海 200234; 2. 中国科学院上海辰山植物科学研究中心, 上海辰山植物园, 上海 201602; 3. 中南林业科技大学林木遗传育种实验室, 湖南长沙 410004)

摘要 以花果发育周期 2 年的麻栎 (*Quercus acutissima*) 为试验材料, 测试不同组织制片软化方案, 摸索适合石蜡切片显微制片方法, 并对不同软化处理后的材料进行切片和花粉管荧光染色, 以确定对下游试验的影响。结果表明, 对于雌花发育早期, 花柱及子房壁木质化程度较低的材料, 采用 1.0 mol/L NaOH、1.0 mol/L HCl 和 10% Na₂SO₃ 高温高压软化各 1.5 h, 均可在 1 d 内完成软化及解剖, 但对木质化程度高的雌花材料效果不佳。甘油乙醇软化剂、冰醋酸软化 2 种方法软化木质化程度高的雌花材料有一定软化效果, 但耗时较长, 处理需 14~180 d。采用 5% 乙二胺溶液, 40 °C 处理对高木质化雌花进行软化效果最佳, 仅需 2~4 d 即可达到预期。经乙二胺软化后材料褐化明显, 需要进一步漂白, 对下游组织染色有一定影响, 但仍为高木质化雌花软化的最佳处理方法。该研究为高木质化花材料的显微制片软化方案提供重要解决方案。

关键词 栎属; 高度木质化雌花; 组织软化方法; 显微制片

中图分类号 S792.181 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)05-0004-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.05.002



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Optimization of Tissue Softening Protocol on High Lignified Flower of *Quercus acutissima* (Fagaceae) for Paraffin Section

SHI Cheng-cheng^{1,2}, NING Xin^{2,3}, LI Ying² et al (1. College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234; 2. Shanghai Chenshan Plant Science Research Center, Chinese Academy of Sciences, Shanghai Chenshan Botanical Garden, Shanghai 201602; 3. The Laboratory of Forestry Genetics, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004)

Abstract *Quercus acutissima*, a biannual fruiting species was used to optimize the tissue softening protocols that were suitable for paraffin section. Moreover, the pollen tubes using Aniline Blue were stained to assess the possible side-effects of the softening to the downstream experiments. The results showed that the softening on the early developing stage pistillate with lignification could be well achieved using 1.0 mol/L NaOH or 1.0 mol/L HCl or using 10% Na₂SO₃ to autoclave for 1.5 hours, respectively, but these methods did not work well on the highly lignified pistillate flowers at later developing stage. The traditional glycerol-ethanol softening and glacial acetic acid soften methods took a long time (more than 14 days up to 180 days) to soft the flower, which was unpractical. Using 5% ethylenediamine solution at 40 °C could efficiently soften the high-lignified pistillate female flowers within 2-4 days, which was the best time-cost efficient method to soften the high lignified flowers. However, this protocol would cause severe tissue browning, which required further whitening treatment using 0.3% bleach. This paper provided an comprehensive solution to proceed the microtome study on highly lignified flowers at different developing stage.

Key words *Quercus*; Lignified pistillate flowers; Tissue softening protocol; Microtome

植物的受精、生殖是生长发育的重要环节, 并与其适应性具有密切关系^[1]。比较形态解剖学通过对植物花部的解剖观察、显微制片等, 分析花的生长发育和受精的过程, 在植物受精生物学中被广泛运用^[2]。其中, 显微制片技术能明确显示花发育的特定时期形态组织精细的变化过程, 而被广泛运用于植物的生殖和发育研究中^[3]。但与其他方法相比, 显微制片的观察方法也存在一些局限, 如前处理流程较为繁琐, 需要探索适合的样品硬度、包埋介质才能得到良好的切片效果^[4]。目前, 在植物比较形态解剖学中常用的方法为石蜡切片法^[5], 这一方法对研究材料的硬度有较高的要求, 如果材料过硬, 会划碎蜡带, 难以获得形态完整的切片用于下游试验观察。因此, 探索样品的软化前处理方案是石蜡切片技术获取高质量切片的关键。

壳斗科 (Fagaceae) 是被子植物中蔷薇亚纲 (Rosidae) 金缕梅目 (Fagales) 中最为特化的一个分支, 花为单性, 雄花为柔荑花序, 而雌花单生或双生于叶腋, 均为无被花^[6]。壳斗科的雌花生长节律较为特化, 普遍存在雌花授粉至授精前有一段较长的休眠期 (2—13 月)^[7]。在授粉期雌花较为幼嫩,

而在后期发育中雌花子房壁和苞片木质化程度高, 十分坚硬, 难以进行显微制片对其生殖发育规律进行解剖观察, 为其受精和生殖生物学的开展带来一定困难^[8]。壳斗科植物具有重要的林业和经济价值^[9], 深入开展这一类群受精生物学、生殖节律的研究, 可为壳斗科植物的育种和保护提供重要技术资料。

目前, 壳斗科雌花形态和受精生物学的相关研究有限, 主要集中于花果发育周期为一年的栗属 *Castanea*^[9] 和栎属 *Quercus*^[10] 中, 对于花果发育周期为 2 年、雌花木质化程度高的石栎属、栲属和栎属的研究较少, 对植物雌花组织制片的软化尚无良好解决方案。笔者选取栎属 *Quercus* 中花发育到果实成熟需要 2 年且雌花木质化程度较高的麻栎 (*Quercus acutissima*) 雌花为材料, 定期收集不同生长时期的雌花, 采用现有显微制片的不同组织软化方法, 对其不同发育时期的雌花进行软化处理, 筛选适合雌花材料显微制片的组织软化处理方案, 为后续壳斗科生殖生物学的开展提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试材料麻栎的雌花采集于上海辰山植物园内 (121°11'5.76" E, 31°04'48.10" N) 引种的成熟植株。

1.2 试验方法

1.2.1 不同时期雌花材料的采集和固定。 为追踪麻栎 2 年

基金项目 上海市绿化和市容管理局科技攻关项目 (G162404)。

作者简介 史成成 (1994—), 女, 山东德州人, 硕士研究生, 研究方向: 植物受精生物学。

收稿日期 2019-11-12; **修回日期** 2019-12-03

生雌花不同发育过程,自 2017 年 4 月初麻栎开花伊始进行采集。4 月初采集频率为 7 d/次;5 月麻栎花粉管进入休眠期,采集频率为 1 月/次;至翌年麻栎进入第二年生长季,4 月底其花粉管恢复生长,样品采集频率恢复为 7 d/次,直至 2018 年 9 月果实成熟。每次采集 40~50 朵雌花。收集的雌花迅速放于 FAA 固定液(70%乙醇:5%乙酸:5%福尔马林)中进行固定,并抽真空 15 min,促使固定液快速渗透到雌花(果实)中,而后放于 4 ℃冰箱中固定,7 d 后转移到 70%乙醇中长期储存于 4 ℃冰箱,以备试验待用^[11-12]。

选取具有代表性时期的样品进行软化试验。选取 2018 年当年生样品:5 月 15 日、8 月 15 日、12 月 15 日,2018 年二年生样品:4 月 15 日、6 月 15 日 5 个时期的样品运用不同试验方法进行软化处理。

1.2.2 麻栎不同时期雌花的软化试验方案。解剖前处理:对于当年生花柱及外部总苞木质化程度较低的麻栎雌花进行简单处理,将花柄及最外层苞片切掉即可;对于较硬、木质化程度严重的 2 年生雌花,须去除外部总苞及部分木质化的子房外壁,以便软化剂进入雌花。

在前人研究的基础上加以改进,具体软化方法和步骤:

(1)NaOH(氢氧化钠)软化法。软化参考前人对竹子等软化木质素的方法^[13-14]。选取 5 个时期的待软化样品各 10 枚于试管中,加入试验材料 5 倍及以上样品体积的 1 mol/L NaOH,于 60 ℃恒温水浴 1.5 h,期间取出样品用解剖针检测软化程度,至解剖针可轻易插入样品内部。NaOH 溶液加热时间可根据需解剖材料的木质化程度进行调整。NaOH 软化会使试验材料褐化,其软化后的材料需采用 50% NaClO(次氯酸钠)漂白,直至试验材料变为白色。由于 NaClO 具有腐蚀性^[15],也对试验材料有软化作用,需要随时进行观察,待材料变为白色及时取出。

(2)HCl(盐酸)软化法。依据 HCl 的强腐蚀性软化试验材料^[16]。5 个时期的试验材料各 10 枚置于 5 倍及以上样品体积的 1 mol/L HCl 溶液,进行沸水浴 1.5 h 达到软化效果。具体软化时间根据试验材料软硬程度而定。将试验样品在无菌水或 30%乙醇中解剖,观察软化效果,若雌花材料仍较硬,可继续进行沸水浴软化处理,直至解剖针可毫不费力插入样品内部。

(3)Na₂SO₃(亚硫酸钠)高温高压软化法。按质量体积比配制 10%的 Na₂SO₃ 溶液。选取同上 5 个时期的麻栎雌花各 10 枚,将已经木质化的苞片及子房壁剖去后,置于配制好的溶液中,溶液体积为样品体积的 5 倍及以上。高压灭菌锅调至 121 ℃,进行 1.5 h 的高温高压来软化组织^[17],降温后检测软硬程度。若材料仍较硬,将试验材料于 NaClO 中漂白,直至达到软化效果。

(4)甘油-乙醇软化法。采用甘油-乙醇软化法^[18],即采用甘油和 95%乙醇按 1:1 配制为混合液。将 5 个时期的试验样品各 10 枚浸于 5 倍样品体积的软化剂中进行软化,为期 180 d。软化后样品用无菌水漂洗,将甘油冲洗干净,进行脱水、透明、切片,检测软化后样品。

(5)CH₃COOH(冰醋酸)软化法。雌花样品经 FAA 固定、乙醇预处理后,增加了以冰醋酸软化木质部这一步骤,用正丁醇(CH₃(CH₂)₃OH)取代二甲苯进行组织透明,其余步骤参考常规方法。具体方法:选取 FAA 中 5 个时期的麻栎雌花样品各 10 枚分别进行梯度乙醇脱水、软化透明、透蜡及染色,具体步骤如下:80%乙醇 1 h→95%乙醇 1 h→100%乙醇 1 h×2 次→冰醋酸 48~72 h→冰醋酸/无水乙醇(V:V=1:3) 1 h→无水乙醇 1 h×2 次→100%乙醇/正丁醇(V:V=1:1) 1 h→正丁醇 I 2 h→正丁醇 II 2 h→正丁醇/石蜡(V:V=1:1) 45 ℃→石蜡 45 ℃,每日升高 2 ℃,直至 65 ℃→包埋→切片(10 μm)→贴片→展片→中和 pH→苯胺蓝染色 12 h→镜检^[19]。

(6)C₂H₈N₂(乙二胺)软化法。将乙二胺稀释至浓度 5%乙二胺溶液,需进行显微制片的试验材料在脱水前用 5%乙二胺溶液在 60 ℃下软化处理 4 d,再采用常规脱水、透明步骤进行石蜡切片^[9,18]。

具体步骤:取 5 个时期已固定样品各 10 枚浸于 5%乙二胺溶液中,60 ℃温箱中软化 4 d,由于样品褐化为黑色,软化后的材料需用 50%NaClO 漂白,直至试验材料变为白色,10~20 min。

1.2.3 不同软化处理后的荧光显微观察。采用 0.1%水溶性苯胺蓝对花粉管胼胝质染色^[20-22],来观察花粉管在雌花内生长发育节律,以确定花粉管的休眠时间及位置。0.1%苯胺蓝配制方法参考 Currier 等^[23]的方法,即 0.1 g 苯胺蓝溶于 0.01 mol/L K₃PO₄ 溶液,调节 pH 至 7.0。软化后组织在染色之前需置于磷酸缓冲液中浸泡,以调整 pH,磷酸缓冲液配制方法:1 mol/L K₂HPO₄、1 mol/L KH₂PO₄ 混合液,调节 pH 至 7.0。

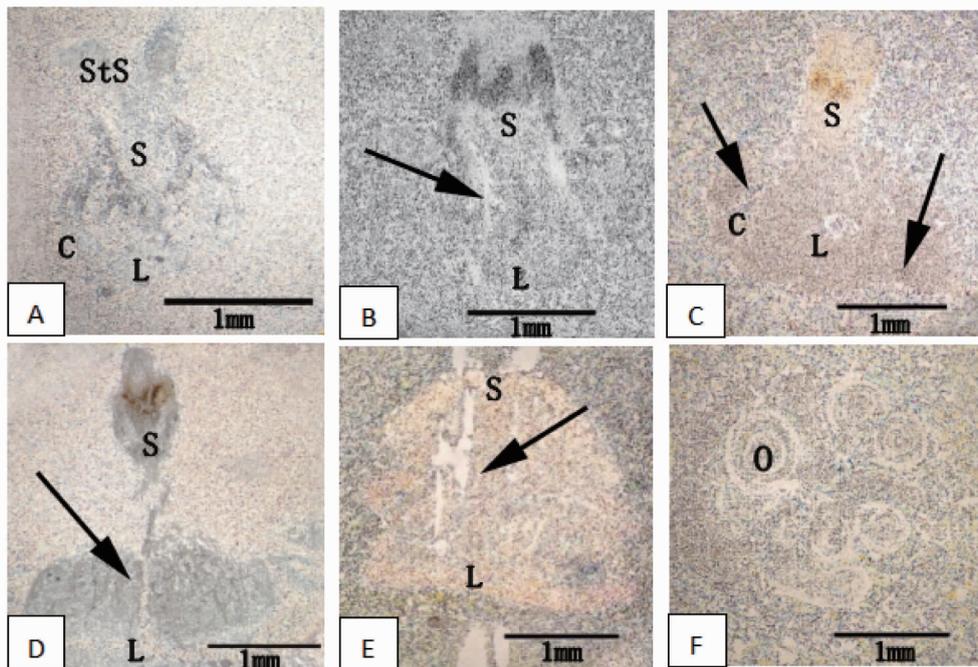
(1)压片法荧光显微观察。软化后的样品用去离子水漂洗 2 遍,每次漂洗 10 min。漂洗后的样品于磷酸缓冲液中,中和 pH,大于 30 min,然后将试验材料浸泡于 1%苯胺蓝染液中染色 12 h,后将染色后的麻栎雌花放入 2 个载玻片中用力压平,甘油封片。在荧光显微镜(DM6000B,Leica)透过分色镜(FT395),二次滤片(LP397),滤色后得到 365 nm UV 光对压片进行观察,并拍片^[10-11,24]。

(2)石蜡显微制片法观察。石蜡显微制片方法以 Stewart^[5]的标准石蜡切片法为基础,在此方法基础上进行改进,具体步骤:将软化及漂白后的麻栎雌花进行 30%、50%、70%、85%、95%梯度乙醇脱水,每梯度中样品分别停留 1.5 h,然后采用无水乙醇脱水 2 次,每次 30 min。透明采用乙醇-二甲苯系列进行(乙醇:二甲苯=2:1、1:1、1:2每梯度 1.5 h)梯度透明,最后在纯二甲苯中分别浸泡 2 次/1 h。将已透明样品转入 42 ℃缓慢升温透蜡,每天升温 2 ℃,直至 65 ℃,后用纯石蜡(Plaphoast 65 ℃)质换 2 次,在包埋台上用 65 ℃熔点石蜡进行包埋。包埋后样品采用 Leica 切片机进行显微制片,根据切片质量,推断软化效果。切片厚 10 μm,脱蜡复水后,将玻片置于 1%苯胺蓝染液染色 12 h,后置于荧光显微镜(DM6000B,Leica)下用 365 nm 的紫外光进行观察,对比切片质量^[9]。

2 结果与分析

2.1 不同软化方法的比较 不同时期的试验材料,由于木质化程度不同,采用6种软化方法对样品组织软化效果有明显差异。通过石蜡切片法对麻栎雌花的进行切片,判断6种软化方法的效果,具体软化差异对比见图1。对于当年生、木质化程度低的雌花样品,采用 Na_2SO_3 (图1A)、 HCl (图1B)和

NaOH (图1C)均可达到软化效果,其中 Na_2SO_3 软化最为理想。对于木质化程度略高的2年生雌花样品,冰醋酸软化(图1D)和甘油-乙醇软化(图1E)效果差,在蜡带上会出现明显划痕裂隙(图1黑色箭头所指)。乙二胺溶液所软化样品切片(图1F),在体视镜下观察,可以清晰看到保存完整的胚珠,软化效果最佳。



注:A.5月15日1年生麻栎雌花纵切切片($10\% \text{Na}_2\text{SO}_3$ 高温高压软化);B.5月15日1年生麻栎雌花切片(1.0mol/L HCl 软化);C.5月15日1年生麻栎雌花切片(1.0mol/L NaOH 软化);D.4月15日2年生麻栎雌花切片(冰醋酸软化法软化);E.4月15日2年生麻栎雌花切片(甘油乙醇软化剂软化);F.6月15日2年生麻栎雌花横切切片(乙二胺溶液软化)。苞片(C)、柱头(StS)、花柱(S)、子房室(L)、胚珠(O)

Note:A. First year pistillate flowers harvested on 15th May used for $10\% \text{Na}_2\text{SO}_3$ softening treatment;B. Sections on pistillate flowers of current year harvested on 15 May using 1.0mol/L HCl softening protocol;C. Sections on pistillate flowers of current year harvested on 15 May using 1.0mol/L NaOH softening protocol;D. Sections on biennial pistillate flowers harvested on 15 April using glacial acetic acid softening protocol;E. Sections on biennial pistillate flowers harvested on 15 April using glycerol-ethanol softening protocol;F. Sections on biennial pistillate flowers harvested on 15 June using $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2$ softening protocol. Bract(C), Stigma(StS), Style(S), Ovary(L), Ovule(O)

图1 不同软化方法对麻栎雌花各时期石蜡切片的影响

Fig.1 Effect of different softening methods on paraffin sections of female flowers of *quercus aculeus*

2.2 不同软化处理对样品后期荧光染色的影响 试验材料下游荧光染色效果受软化试剂pH影响,具体荧光染色效果对比见图2。 NaOH 溶液(图2A)、 HCl 溶液(图2B)、乙二胺软化(图2C)以及 Na_2SO_3 高温高压软化(图2D)的组织,苯胺蓝染色后均可观察到花粉管的荧光信号(图2白色箭头所指)。 $10\% \text{Na}_2\text{SO}_3$ 高温高压软化法所软化的早期雌花样品的压片中可清楚观察到聚集于花柱偏上1/3处的花粉管;乙二胺溶液软化的木质化程度较高,样品压片所观察到的花粉管最为清晰,主要分布于花柱下部1/3处。经冰醋酸软化样品(图2E)和乙醇-甘油软化样品(图2F)苯胺蓝染色后镜检,无法观察到花粉管的荧光信号。不同方法的软化效果和对下游苯胺蓝染色的影响见表1。不同软化方法优、缺点对比见表2。

3 讨论

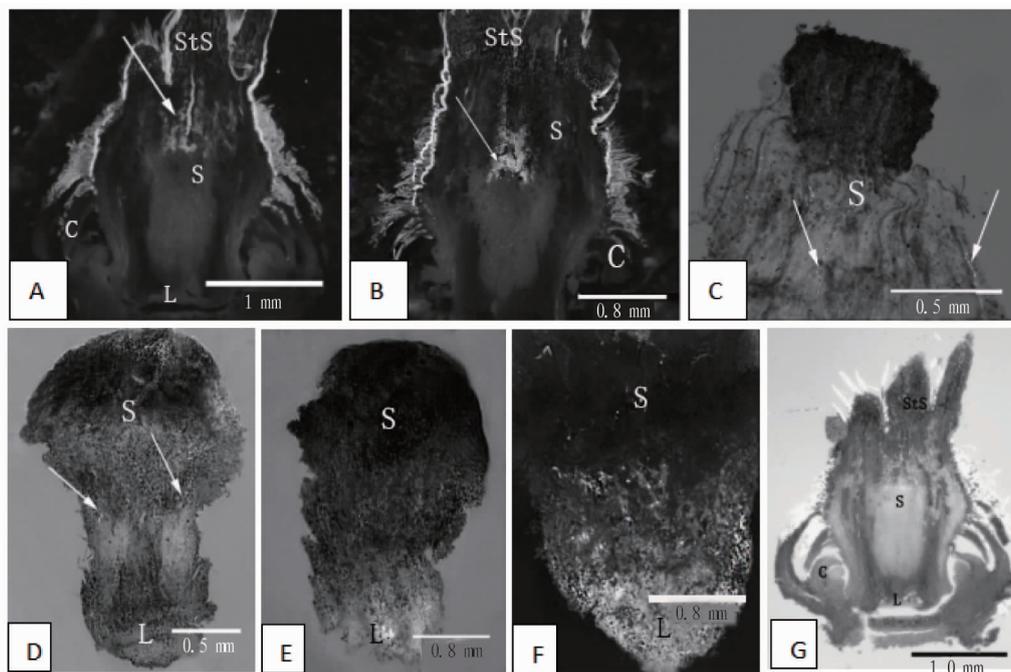
在花粉管生长过程中,授粉后麻栎花柱会较快木质化并

变硬,因此,花柱软化及受精前子房壁软化是试验关键环节^[8]。在显微制片中,植物材料的前处理主要可分为物理软化法和化学软化法两大类,它们通过改变细胞壁分子结构和宏观性能,溶解和破坏木材内部纤维素等物质结构,破坏其稳定性以达到软化效果^[25]。该研究对几种常用组织软化方法进行测试,所采用的6种软化试剂均为腐蚀性化学试剂,常用于木材、竹材的软化加工^[13]。

研究表明,对于木质化程度较低的试验材料,如当年生麻栎雌花及恢复生长前的2年生麻栎雌花木质化程度低,采用常规化酸、碱和高温高压软化均可以获取良好的软化效果,其中亚硫酸钠高压软化用时最快、软化效果最佳、无褐化、简单快捷,为首选软化方法。对于木质化程度高、多骨质、多石细胞的试验材料,有软化效果的3种方法为乙醇甘油软化剂、冰醋酸和乙二胺,其中乙醇甘油软化剂和冰醋酸软化所需时间长,且软化期间试剂渗入试验材料内部,不易

被缓冲液置换,为下游组织的染色带来一定困难,不适用于花比较形态解剖学的组织软化处理。乙二醇溶液软化法明显缩短了试验时间,最为方便快捷,对下游染色影响最小,在

现有方法中有明显的优势,更适于木质化材料的显微制片软化处理。



注: A. 1.0 mol/L NaOH 溶液软化后样品切片; B. 1.0 mol/L HCl 溶液软化后样品切片; C. 0.5% 乙二醇溶液软化后样品压片; D. 10% Na₂SO₃ 高温高压软化后样品压片; E. 冰醋酸软化后样品压片; F. 甘油-乙醇软化剂软化后样品压片; G. 花部器官切片图: 示苞片(C)、柱头(StS)、花柱(S)、子房室(L)。

Note: A. Paraffin section of pistillate flower pretreated by 1.0M NaOH softening protocol; B. Paraffin section of pistillate flower pretreated by 1.0M HCl softening protocol; C. Sample tableting of pistillate flower pretreated by 0.5% C₂H₈N₂ softening protocol; D. Sample tableting of pistillate flower pretreated by 10% Na₂SO₃ softening protocol; E. Sample tableting of pistillate flower pretreated by Glacial acetic acid softening protocol; F. Sample tableting of pistillate flower pretreated by glycerol-ethanol softening protocol; G. Flower organ slice; Bract (C), Stigma (StS), Style (S), Ovary (L).

图 2 荧光染色后花粉管观察

Fig. 2 Observation of pollen tube after fluorescent staining

表 1 麻栎不同时期木质化雌花的软化方法处理效果对比和对下游试验影响

Table 1 Comparison of softening methods for lignified pistillate flowers of *Quercus acutissima* at different developing stage and their effects to the downstream experiments

样品处理方法 Sample treatment	当年生 3—5 月 Current year harvested on March-May	当年 6 月—翌年 3 月 Current year harvested on June- second year harvested on March	翌年 4 月 Second year harvested on April	翌年 5 月—6 月 Second year harvested on May-June	褐化程度 Degree of browning	下游组织 染色效果 Staining effect of downstream tissue
1.0 mol/L NaOH 溶液软化法 1.0 mol/L NaOH softening protocol	++ TT	++ TT	failed	failed	+++	+
1.0 mol/L HCl 溶液软化法 1.0 mol/L HCl softening protocol	++ TT	++ TT	failed	failed	++	++
10% Na ₂ SO ₃ 高温高压软化法 10% Na ₂ SO ₃ softening protocol	+++ T	++ T	failed	failed	+	+++
冰醋酸软化法 Glacial acetic acid softening protocol	failed	failed	— TTT	— TTT	failed	failed
甘油-乙醇软化法 glycerol-ethanol softening protocol	failed	failed	— TTT	— TTT	failed	failed
0.5% 乙二醇溶液软化法 0.5% C ₂ H ₈ N ₂ softening protocol	failed	failed	+++ TT	++ TT	+++	+++
雌花的木质化程度 Degree of ligni- fied pistillate flowers	较低	低	高	较高		

注: —. 软化效果差/褐化程度低/染色效果差; +. 软化效果一般/褐化程度较低/染色效果一般; ++. 软化效果良好/褐化程度较高/染色效果良好; +++
+. 软化效果最佳/褐化程度高/染色效果佳。TTT. 耗时长; TT. 耗时短; T. 耗时较短; failed. 软化失败

Note: —. Poor softening effect / low browning / poor dyeing effect; +. Softening effect is generally / browning is relatively low / dyeing effect is general; ++.
Good softening effect / high degree of browning / good dyeing effect; +++. The softening effect is best / the degree of browning is high / the dyeing effect
is good. TTT. Time consuming; TT. Short time; T. Shorter time; failed. Softening failure

在软化过程中会改变样品(或组织)的pH,进而可能会对下游荧光染色造成较大影响,软化后样品(或组织)中软化剂和缓冲液是否置换完全,是荧光染色试验成败的关键^[14]。

显微组织观察试验表明,荧光染色样品以pH 6.7为最适,此时花柱与背景的颜色对比明显,可清晰观察到花粉管,pH低于或高于6.7均无法观察到结构完整的花粉管^[26]。

表2 石蜡切片中木质化植物材料的不同软化方法优缺点对比

Table 2 Comparison of advantages and disadvantages of different softening protocols on lignified plant materials in paraffin sections

不同软化方法 Different softening protocols	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
NaOH 溶液软化法 NaOH softening protocol	耗时短,适用于木质化程度低的样品	褐化严重,对后期染色有一定影响
HCl 溶液软化法 HCl softening protocol	耗时短,适用于木质化程度低的样品	沸水浴时长不宜掌控
Na ₂ SO ₃ 高温高压软化法 10% Na ₂ SO ₃ softening protocol	简单快捷,适用于木质化程度低、中的样品	最高温度及高压时长不宜掌控
甘油-乙醇软化剂 glycerol-ethanol softening protocol	适用于木质化程度高的试验材料	耗时长,而且进入材料的甘油不易清洗,影响后期染色
冰醋酸软化法 Glacial acetic acid softening protocol	适用于木质化程度高的试验材料	耗时长,材料中的冰醋酸不易被缓冲液置换,影响后期染色
乙二醇溶液软化 0.5% C ₂ H ₈ N ₂ softening protocol	适用于木质化程度高的试验材料,耗时短	毒性很大

植物发育不同时期,木质化程度不同,所应用的软化方法、软化剂的浓度以及软化时间也随之变化;无论哪种软化方法,针对木质化程度不同的试验材料,其浓度和软化时间均要进行相应调整。该研究探索了一套适合于壳斗科栎属高木质化雌花石蜡切片制片的软化处理方法,为今后开展壳斗科植物的受精生物学和胚胎学研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 胡适宜. 被子植物胚胎学[M]. 北京:人民教育出版社,1982:67-101.
- [2] 刘明英. 百合科植物比较形态解剖学研究——II. 万年青、吉祥草、紫花玉簪、芦荟、吊兰后生木质部管状分子的比较解剖[J]. 四川大学学报(自然科学版),1992,29(1):149-154.
- [3] 李正理. 植物组织制片学[M]. 北京:北京大学出版社,1996:50-161.
- [4] 叶宝兴,毕建杰,孙印石. 植物细胞与组织研究方法[M]. 北京:化学工业出版社,2011:54-63.
- [5] STEWART J A. Manual of histological techniques and their diagnostic application[J]. Histopathology, 1995,26(1):95.
- [6] HUANG C J, ZHANG Y T, BRUCE B. Fagaceae [M]//WU Z Y, RAVEN P H. Flora of China Cycadaceae through Fagaceae. Beijing: Science Press and Missouri Botanical Garden Press, 1999:314-400.
- [7] SOGO A, TOBE H. Delayed fertilization and pollen-tube growth in pistils of *Fagus japonica* (Fagaceae) [J]. American journal of botany, 2006,93(12):1748-1756.
- [8] BORGARDT S J, NIXON K C. A comparative flower and fruit anatomical study of *Quercus acutissima*, a biennial-fruited oak from the *Cerris* group (Fagaceae) [J]. American journal of botany, 2003,90(11):1567-1584.
- [9] 邓敏. 壳斗科栎属青冈亚属的形态解剖、分类、分布及其系统演化[D]. 昆明:中国科学院昆明植物研究所,2007:30-70.
- [10] 许慧玲,曹慧娟,李天庆. 板栗(*Castanea mollissima* B1.)的胚胎学研究——(I)胚珠、胚囊发育、受精和胚发生[J]. 北京林业大学学报,1988,10(1):10-16.
- [11] 许晨光,刘泽涛,苑少华,等. 不同固定液对小麦花粉母细胞微丝骨架

荧光标记的效果[J]. 作物杂志,2012(4):13-16.

- [12] DENG M, ZHOU Z K, CHEN Y Q, et al. Systematic significance of the development and anatomy of flowers and fruit of *Quercus schottkyana* (*Subgenus Cyclobalanopsis*; Fagaceae) [J]. International journal of plant sciences, 2008, 169(9):1261-1277.
- [13] 赵瑞艳,付钧钧,孙婷. 不同软化处理方法对竹材质量的影响[J]. 佳木斯大学学报(自然科学版),2009,27(4):637-640.
- [14] 程云清,张会弟,刘剑锋. 榛子木质化花柱软化方法的改进[J]. 吉林师范大学学报(自然科学版),2015(3):125-128.
- [15] 邱立军,赵维忠,孙开英,等. 次氯酸钠杀灭微生物效果与腐蚀性的试验观察[J]. 中国消毒学杂志,1998,15(2):110-112.
- [16] 张明宇. 快速离析干燥木材的方法[J]. 生物学通报,2000,35(1):43.
- [17] BOAVIDA L C, VARELA M C, FEIJO J A. Sexual reproduction in the cork oak (*Quercus suber* L.). I. The progametic phase [J]. Sexual plant reproduction, 1999, 11(6):347-353.
- [18] 胡玉熹,林金星. 高度木质化材料软化的简便方法[J]. 植物杂志,2000(3):31.
- [19] 蔡海滨,涂敏,胡彦师,等. 一种优化的橡胶树木质部石蜡切片制作方法[J]. 热带农业科学,2015,35(6):25-28.
- [20] 王秀文. 石蜡切片法中染色技术的改良[J]. 植物研究,2015,35(1):158-160.
- [21] CECICH R A. Pollen tube growth in *Quercus* [J]. Forest science, 1997,43(1):140-146.
- [22] KHO Y O, BAËR J. Observing pollen tubes by means of fluorescence [J]. Euphytica, 1968, 17(2):298-302.
- [23] CURRIER H B, STRUGGER S. Aniline blue and fluorescence microscopy of callose in bulb scales of *Allium cepa* L [J]. Protoplasma, 1956,45(4):552-559.
- [24] 李师翁,屠明珠. 用苯胺蓝压片法观察小孢子和雄配子体发育过程中胼胝质的动态[J]. 植物学通报,1990,7(1):60-63.
- [25] 谢延军,符启良,王清文,等. 木材化学功能改良技术进展与产业现状[J]. 林业科学,2012,48(9):154-163.
- [26] 朱书生,刘西莉,刘鹏飞,等. 6种染色方法对黄瓜霜霉病菌不同发育阶段的染色效果比较[J]. 植物病理学报,2006,36(1):86-90.

(上接第3页)

- [6] 芦建国,熊钢. 蜡梅品种花粉粒扫描电镜特征的分类研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2010,34(4):145-148.
- [7] 张彦妮,钱灿. 12种百合属植物花粉形态扫描电镜观察[J]. 草业学报,2011,20(5):111-118.

- [8] 埃尔特曼 G. 孢粉学手册[M]. 中国科学院植物所,译. 北京:科学出版社,1978.
- [9] 郝刚,胡启明. 绣球亚科花粉形态的研究[J]. 热带亚热带植物学报,1996,4(3):26-31.
- [10] 陈海霞,彭影晖. 基于 SRAP 标记揭示中国绣球属部分种类的亲缘关系[J]. 分子植物育种(网络版),2012,10(15):1115-1121.