

技术与方法 Techniques and Methods

禾本科植物叶片表皮气孔观察的样品制备方法改良

师长海^{1,2}, 李玉欣^{1,2}, 董宝娣¹, 乔匀周¹, 刘孟雨^{1,*}¹中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心农业水资源重点实验室, 河北省节水农业重点实验室, 石家庄050021;²中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要:对现有的禾本科植物叶片气孔观察的样品制作方法中的不足作了一些改良。改良后的方法操作简便、耗时少、样品制备成功率高,且放大后的效果好,不会造成气孔形态的改变。改良方法适用于禾本科植物和其他叶肉紧实不易剥离的植物叶片。50% NaClO处理3 min最适用于小麦旗叶表皮样品的制备。

关键词:禾本科植物;叶片表皮;气孔观察

An Improving Method of Sample Preparation for Epidermis Stoma Observation of Gramineous Plants Leaves

SHI Chang-Hai^{1,2}, LI Yu-Xin^{1,2}, DONG Bao-Di¹, QIAO Yun-Zhou¹, LIU Meng-Yu^{1,*}¹Key Laboratory of Agricultural Water Resources & Hebei Key Laboratory of Agricultural Water-Saving, Center for Agricultural Resources Research, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Shijiazhuang 050021, China;²Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: The method of sample preparation for epidermis stoma observation of gramineous plants leaves was improved. The improved method was easy to operate, timesaving. It also had high success rate, and kept the good shape of stoma after enlarged. The improved method was applicable to gramineous plants and other leaves with compacted mesophyll. The treatment of 50% NaClO for 3 min was best for obtaining epidermis sample of wheat boot leaf.

Key words: gramineous plants; leaf epidermis; stoma observation

气孔是高等植物叶片调控光合作用和蒸腾作用的结构,气孔特性是植物生理学、生态学和农业基础研究中的一个内容,而且叶表皮性状在植物分类学和系统学中也有一定价值(马清温等 2005; 吉春容等 2008; 袁莉民等 2006; 赵秀琴等 2003; 郑淑霞和上官周平 2005)。除徒手刮制法外,植物叶表皮细胞和气孔形态的研究方法主要有印迹法、撕取法、透明胶带粘取法、透明胶带刮制法及恒温离析刮制法等(陈佰鸿等 2004; 段云峰等 2008; 张守仁和高荣孚 1999; 温洁 1995; 张秀芳等 2002)。徒手刮制时,重则容易将叶片刮破,轻则容易残留叶肉,对操作技术要求较高,且适用范围有限,而其优点是能够较好的保持叶片表皮的原状。印迹法是将火棉胶、指甲油、牛皮胶等涂在叶片表面,待胶液风干后,撕取胶膜作为观察材料,此方法操作简单快速,但有存在胶膜不易撕取,风干和撕取时易变形,受禾本科植物表皮毛的影响膜上印迹不易辨认等问题。撕取法和透明胶带粘取法也有简

单快速的特点,但只适用于部分表皮易撕离的植物材料,对表皮与叶肉结合紧密的禾本科植物几乎不能撕(粘)取理想的观察材料。胶带刮制法则由于叶肉刮除不彻底和胶带自身透明效果差而影响观察。常规离析法需要恒温处理 24~48 h,即使改良的方法也需要 1.5~6 h,由于离析时间的长短不一而不易把握,且易导致离析不彻底,或腐蚀叶片表皮,操作繁琐。本文中改良的禾本科植物叶片观察法有操作简单快速和容易获得理想的观察材料等特点。

收稿 2009-11-24 修定 2010-02-25

资助 国家“863”计划(2006AA100221)、国家科技支撑计划(2009BADA3B-03-08)、中国科学院创新方向性项目(KSCX2-YW-N-004)、中国科学院创新方向性项目(KSCX2-YW-N-042-01)、国家自然科学基金(30870411)和国家“十一五”科技支撑计划(2008BAD95B13-04)。

* 通讯作者(E-mail: mengyuliu@ms.sjziam.ac.cn; Tel: 0311-85871562)。

材料与方法

1 改良的原理

初步刮制可促使NaClO与残余叶肉充分接触, 加速叶脉和叶肉的离析漂白。

2 材料与用品

植物材料为生长条件一致的灌浆期大田冬小麦(*Triticum aestivum* L.)旗叶中部, 取样后立即用标准固定液(福尔马林-冰醋酸-酒精混合固定液, FAA)固定。

操作用品有: 普通剃须刀片、镊子、盖玻片、载玻片、胶头滴管、吸水纸、蒸馏水、不同浓度NaClO、秒表。

3 试验方法

3.1 改良刮制法的操作流程 (1)初步刮制: 剪取经FAA固定的小麦旗叶中部片约2 cm, 目标表皮朝下置于平整的小操作平台(可用盖玻片包装盒或载玻片代替)。加1~2滴蒸馏水, 用刀片顺叶脉方向刮去上面的表皮和大部分叶肉, 刮制时刀片竖直, 用力均匀。(2)快速离析: 在经过初步刮制的叶片上加1~2滴50% NaClO (以浸润整块材料为宜)。静置约2 min (视植物材料和初步刮制的情况而定)待叶肉变白。(3)二次刮制: 用蒸馏水冲洗掉离析液, 加1~2滴蒸馏水, 再将剩余的叶肉刮掉。(4)转移: 再

一次用蒸馏水冲洗刮制完成的叶片, 截去过多的部分, 将载玻片贴压在刮好的材料上, 依靠水的吸力转移到载玻片上, 转移以后目标表皮外侧朝上可以直接加盖玻片观察, 染色后观察, 或脱水后做成永久样品。操作过程中应注意保持材料的湿润。

3.2 改良方法的优化 优化方案设25%、50%和75% 3个浓度水平的NaClO处理, 1、2和3 min的处理时间, 共9个处理。按照上述操作流程, 初步刮制后的叶块(冬小麦灌浆期旗叶中部)滴加NaClO, 使叶块完全浸没, 立即计时。处理结束时立即用吸水纸吸去残液, 然后加蒸馏水, 进行二次刮制。做成临时装片后在Zeiss Axioplan 2 imaging MOT生物显微镜下放大200倍观察并拍照。

3.3 改良法可靠性验证方法 分别将由最优改良方案(50% NaClO处理2 min)和传统徒手刮制得到的小麦旗叶上表皮样品放大200倍后拍照, 用Axio Vision 4.0软件测量气孔长度和宽度(包括副保卫细胞), 每块叶片测量连续的5个气孔, 共测定6块叶片。

实验结果

1 植物叶片表皮样品制备方法的比较

由改良法得到的表皮图片比较清晰, 气孔及表皮细胞的边界清晰, 无残余叶肉的干扰, 易于辨认

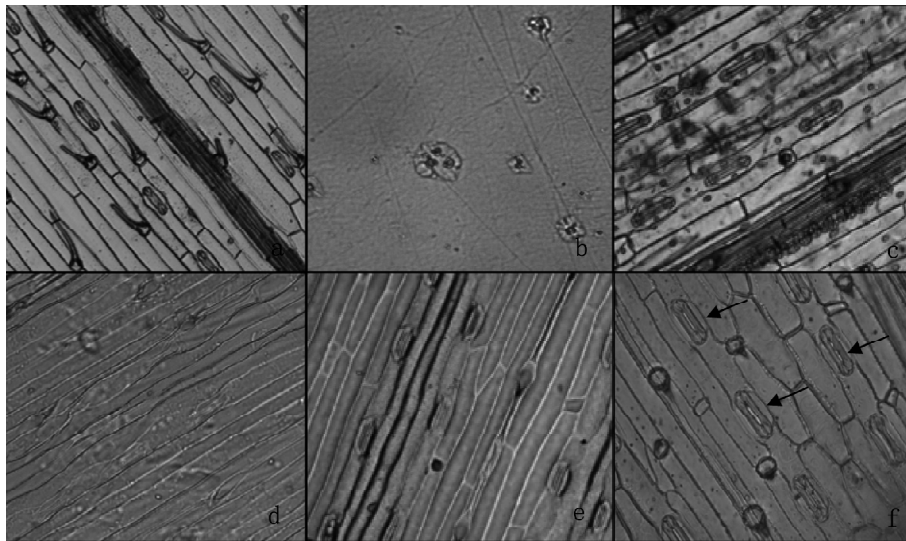


图1 不同方法制备的小麦叶片表皮比较

Fig.1 Comparison of wheat leaf epidermis made by different methods

a: 由改良法得到的表皮; b: 由胶带刮制法得到的表皮; c: 胶带自身的纹理; d: 由印迹法(火棉胶)得到的表皮; e: 由印迹法(指甲油)得到的表皮; f: 改良法得到的表皮上气孔开闭情况。均放大200倍。

和测量(图 1-a)。由于小麦表皮与叶肉结合较紧密, 叶肉不容易彻底刮除, 且胶带自身的透明性不佳(图 1-b), 由胶带刮制法得到的表皮模糊不利于辨认和测量(图 1-c)。而由印迹法(特别是火棉胶法)得到的表皮边界模糊、纹理复杂不易分辨和测量, 而且在撕取胶膜时引起的印迹变形无法估算(图 1-d、e)。由图 1-f 可见, 改良法制取的表皮可以观察到张开的气孔。

2 改良法可靠性的验证

由改良法和徒手法得到的气孔长度分别为 1.45 和 1.44 μm , 相差 0.69%, 差异不显著(表 1); 由改良法和徒手法得到的气孔宽度分别为 0.705 和 0.708 μm , 相差 0.43%, 差异也不显著。

3 植物表皮样品制备改良方法的优化

用 25% 的 NaClO 处理 1、2 min 后刮制的小麦叶片表皮样品, 在表皮上还残留有叶肉细胞(图 2-

表 1 改良法和徒手法的小麦叶片表皮气孔的形态比较

Table 1 Morphology comparison of wheat leaf epidermis stoma of improved and hands free methods

	气孔长度/ μm	气孔宽度/ μm
改良法	1.45 \pm 0.030 ^a	0.705 \pm 0.020 ^a
徒手法	1.44 \pm 0.046 ^a	0.708 \pm 0.032 ^a

表内数据为平均数 \pm 标准误差, 小写字母相同表示在 0.5 水平差异不显著。

a、b); 25% NaClO 处理 3 min 刮制的表皮样品无叶肉细胞残留(图 2-c)。用 50% NaClO 处理 1 min 的表皮依然有叶肉细胞残留, 而处理 2、3 min 后叶片表皮较清晰(图 2-d、e、f)。75% NaClO 处理 1 min 后刮制的表皮样品较清晰(图 2-g), 与 50% NaClO 处理 2、3 min 的效果相似。75% NaClO 处理时间增加到 2、3 min 时, 副保卫细胞边界模糊

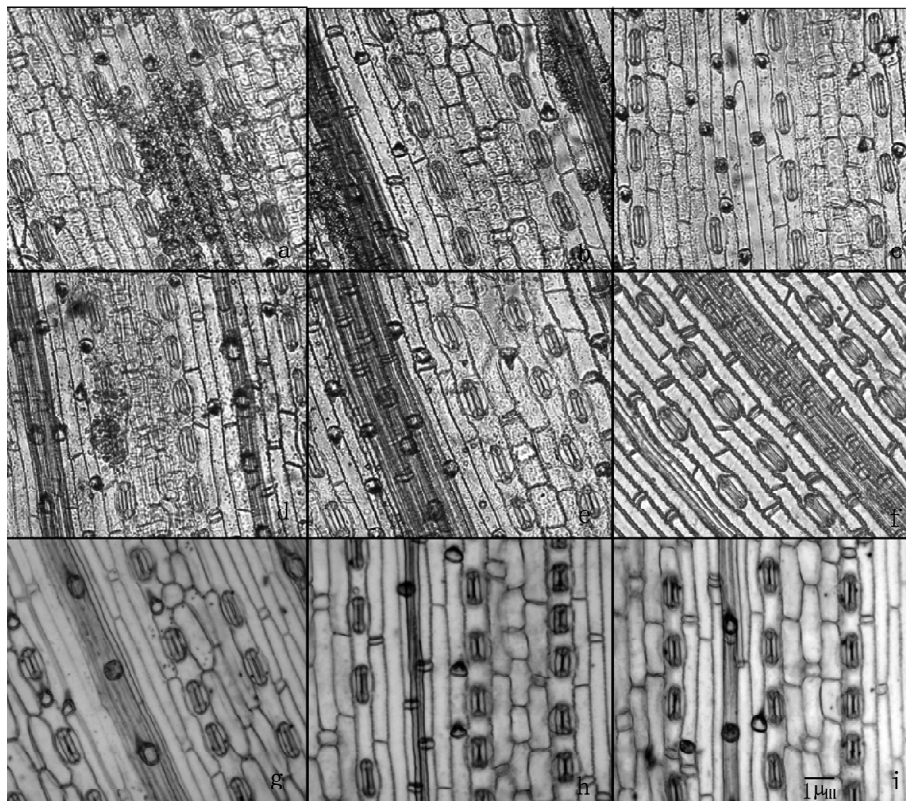


图 2 改良法的优化试验结果

Fig.2 The optimization results of improved method

a: 25% NaClO 处理 1 min; b: 25% NaClO 处理 2 min; c: 25% NaClO 处理 3 min; d: 50% NaClO 处理 1 min; e: 50% NaClO 处理 2 min; f: 50% NaClO 处理 3 min; g: 75% NaClO 处理 1 min; h: 75% NaClO 处理 2 min; i: 75% NaClO 处理 3 min。均放大 200 倍。

不易辨识(图 2-h、i), 且表皮变脆、易碎。

讨 论

本文中的改良刮制法适用于新鲜叶片或经标准固定液(FAA)固定的样品, 用品简单易得; 此法操作过程简便, 统筹操作过程可以交叉进行操作, 在静置快速离析的空隙进行下一个叶片的初步刮制, 耗时少。此方法中的初步刮制可以促使 NaClO 与叶肉充分接触, 有加速离析和漂白的作用, 克服了胶带刮制法中叶肉残留和刮制伤及下表皮的缺点; 快速解离可以解决恒温离析法中的耗时长, 离析时间不易把握等问题; 二次刮制时残余的叶肉和叶脉已经过离析变得松散, 只需轻轻地刮拭即可。由于初步刮制不触及叶片下面的表皮, 不存在撕裂表皮的问题, 而且离析过程快速, 因此制备样品成功率相对较高, 耗时大大减少。此法还可能适用于其他禾本科植物或角质层厚、叶肉紧密难以用撕(粘)取方法得到表皮样品的植物材料。

徒手法是常规的制备叶片表皮样品的方法(杨利民等 2007; 苗芳等 2003)。从用此方法与徒手刮制法的结果比较可知: 两种方法获得的气孔长、宽度无显著差异, 这表明: 此方法中的初步刮制、快速解离和二次刮制没有造成表皮形态的改变, 能够真实地反映小麦叶片表皮的气孔和表皮细胞的状态。采用此方法制备的小麦叶片表皮中能够观察到张开的气孔。虽然此方法耗时较少, 但是因为气孔开闭对外界环境的变化较敏感(李扬和黄建辉 2009), 所以此方法制备表皮样品过程中是否会造成气孔开度的改变, 尚待进一步验证。

从本文结果来看, 25% NaClO 处理 3 min、50% NaClO 处理 2、3 min 和 75% NaClO 处理 1 min 后得到的叶片表皮图像相对较清晰。其中, 50% NaClO 处理 3 min 时的效果最好, 且时间适中, 处理后的表皮韧性较强不易刮破。延长 25% NaClO 的处理时间可能会得到相对较理想的效果, 但是这样会增加改良法的耗时。虽然 75% NaClO 处理 1 min 得到的图像效果也较好, 但是浓度过高

的 NaClO 离析力太强, 处理后的表皮变脆而易碎。另外, 75% 的 NaClO 挥发强烈, 产生的有毒气体 Cl₂ 对操作者有害。

改良法得到的表皮样品观察不到表皮细胞和副保卫细胞的细胞核, 可能是在离析过程中被解离掉了, 或者在二次刮制时被刮掉了。因此, 改良法不适用表皮细胞核和副保卫细胞核相关指标的研究。

总之, 本文中的改良刮制法具有操作简便、耗时少和观察效果好等特点。由改良法制备的叶片表皮样品能够真实的反映表皮细胞和气孔形态。以 50% NaClO 处理 3 min 是小麦叶片表皮样品制备的最优改良方案。此种改良法不适用于表皮细胞核和副保卫细胞核的相关研究, 但此方法的操作流程是否影响气孔开度尚待进一步研究。

参考文献

- 陈佰鸿, 李新生, 曹孜义, 姚庆荣(2004). 一种用透明胶带粘取叶片表皮观察气孔的方法. 植物生理学通讯, 40 (2): 215~218
- 段云峰, 王幼宁, 李霞(2008). 一种获得叶片表皮观察气孔的简易方法及其应用. 华北农学报, 23 (增刊): 73~76
- 吉春容, 李世清, 冯宏昭, 张福锁(2008). 施氮对不同品种夏玉米冠层叶片气孔特性的影响. 植物生理学通讯, 44 (1): 74~80
- 李扬, 黄建辉(2003). 库布齐沙漠中甘草对不同水分和养分供应的光合生理响应. 植物生态学报, 33 (6): 1112~1124
- 马清温, 李凤兰, 李承森(2005). 落羽杉属(杉科)叶表皮结构及气孔参数. 植物分类学报, 43 (6): 517~525
- 苗芳, 张嵩午, 周春菊, 冯佰俐, 冯治国, 康健(2003). 冷型小麦解剖结构特征的研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 31 (2): 121~124
- 温洁(1995). 一种快速叶表皮离析法. 植物学通报, 12 (增刊): 72, 77
- 杨利民, 韩梅, 周广胜, 李建东(2007). 中国东北样带关键种羊草水分利用效率与气孔密度. 生态学报, 27 (1): 16~24
- 袁莉民, 仇明, 王朋, 王志琴, 杨建昌(2006). C4 转基因水稻秧苗叶片气孔与叶鞘维管束结构特征. 中国农业科学, 39 (5): 902~909
- 张守仁, 高荣孚(1999). 介绍一种改进的研究气孔运动的方法. 植物学通报, 16 (1): 89~92
- 张秀芳, 石东里, 张兰(2002). 观察植物气孔结构的简易方法. 生物学通报, 37 (6): 42
- 赵秀琴, 赵明, 肖俊涛, 张文绪, 关东明, 王美云, 陆军, 臧宁(2003). 裁野稻远缘杂交高光效后代及其亲本叶片的气孔特性. 作物学报, 29 (2): 216~221
- 郑淑霞, 上官周平(2005). 陆生植物气孔参数与大气 CO₂ 浓度变化. 生态科学, 24 (3): 264~267