

技术与方法 Techniques and Methods

一种用透明胶带粘取叶片表皮观察气孔的方法

陈佰鸿^{1,2,*} 李新生² 曹孜义³ 姚庆荣¹甘肃农业大学¹园艺系,³农学院,兰州 730070; ²陕西理工学院陕西省资源生物重点实验室,汉中 723001

A Method for Observing Stoma by Transparent Gummed Tape to Tear Epidermis from Leaf

CHEN Bai-Hong^{1,2,*}, LI Xin-Sheng², CAO Zi-Yi³, YAO Qing-Rong¹¹Department of Horticulture, ³College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070; ²Bio-Resources Key Laboratory of Shaanxi Province, Shaanxi College of Science and Engineering, Hanzhong 723001

提要 用普通塑料透明胶带粘取叶片下表皮观察植物的气孔,比印迹法和撕取下表皮观察气孔的方法具有操作简单、速度快、真实性强的优点,尤其适宜于试管苗等幼嫩材料的气孔变化动态和形态学指标的研究。此法可以防止因保卫细胞失水而导致气孔开张度的变化,能真实地观察植物不同阶段和时期气孔的变化动态。

关键词 透明塑料胶带;下表皮;气孔;印迹法

气孔是植物叶片进行气体交换的窗口,气孔的形态特征和行为动态是植物光合生理和水分生理研究的一个重要方面^[1~4]。气孔形态观察和气孔运动及其影响因素是植物学和植物生理学两门课程的重要实验内容。植物气孔观察一般采用渗入法、印迹法、固定法和电镜扫描法^[5~7]。这些方法都不同程度地存在操作难度大、程序复杂、效率低、使用药剂多和仪器要求较高等缺点,从而影响了气孔的研究和教学。因此,探索一种用材简单、操作方便、真实性强的制片技术,是教学和科研中亟待解决的问题。本文在全面分析和总结以上实验方法不足之处的基础上,探索出了用透明塑料胶带粘取植物叶片下表皮观察气孔的方法,以期能有助于教学和科研工作。

材料与方 法

1 试验材料

塑料透明胶带为普通型胶带,宽度为18 mm,厚度为0.05 mm。

植物材料为葡萄、草莓、珠美海棠、香石竹试管苗,葡萄、珠美海棠组培苗的砂培驯化苗(40 d)和一至二年生田间移栽苗,甜瓜、番茄田间定植苗的叶片。

2 观察气孔的方法

2.1 透明胶带粘取法 塑料透明胶带拉开10~15

cm,胶面朝上,平放在实验台面上。带叶柄剪取植物叶片,用滤纸迅速吸干表面水分。左手捏住叶柄,将叶片正面粘在胶带上。在粘贴过程中,先将叶尖粘贴在胶带上,然后将叶片向叶背面弯曲,逐渐向前推移,使叶片正面与胶带充分接触。为了防止粘贴过程中叶片皱缩,应右手持解剖针,置于叶片与胶带之间进行调整,使叶片平整地粘贴在胶带上。然后剪去叶柄。将胶带对折过来平整地粘贴在叶片的背面。然后用手指对捏胶带,使胶带与叶片的两面充分粘着。将对折的胶带撕开,叶片的正面仍紧密粘贴在胶带上,叶片的背面与胶带分离,并将叶片下表皮粘贴在胶带上。若叶面附着物较多,胶带不能与表皮紧密粘着时,可用胶带连续重复粘贴叶片,直到粘去附着物后,粘取下表皮。为了防止粘取的表皮材料相互重叠,在连续重复粘贴时,应更换胶带新的部位粘着表皮。将带叶片下表皮的胶带沿表皮轮廓剪成3~5 mm×3~5 mm的矩形片。在载玻片上滴2滴蒸馏水、1滴1%的碘-碘化钾染液,将带叶片表皮的胶带胶面向下放在载玻片上染色0.5~1 min,盖上盖玻片,压平后镜检。由于

收稿 2003-08-12 修定 2003-11-24

* E-mail: bhch@263.net, Tel: 0931-7632208

透明胶带粘贴在载玻片上, 在显微镜下观察时, 可带盖玻片观察, 也可将盖玻片取掉后观察, 材料不会移动。

2.2 火棉胶印迹法 用毛笔蘸火棉胶溶液少许涂抹在叶片背面, 干燥后用小镊子将膜取下, 放在载玻片上, 加1滴蒸馏水制片。火棉胶溶液的成分为: 40 g 火棉胶、75 mL 乙醚、250 mL 无水乙醇。

2.3 撕取下表皮法 用小镊子直接撕取叶片的下表皮制片。染色方法同前。

3 气孔的观察与测量

剪取试管苗中部叶片制片, 用Motic数码显微镜在40×物镜下观察拍照。每种方法的制片各拍摄30张, 用Motic Images Advanced图象分析处理系统测定气孔的纵径、横径和气孔的开张面积。

实验结果

1 透明胶带粘取法与其它气孔观察方法的比较

火棉胶印迹法和用镊子撕取下表皮制片是目前观察植物气孔形态最常用的两种方法, 但都有制片所需时间长的缺点。对试管苗幼嫩材料来说, 用镊子撕取叶片下表皮难度更大, 撕下一片

面积约3 mm²的下表皮, 需要10~15 min; 而用火棉胶印迹法, 虽然能一次取得整个叶片的下表皮印迹, 但从涂胶到胶干制片一般需要8~10 min, 而且胶的浓度和厚度直接影响压片的质量和观察效果。用透明塑料胶带粘取叶片下表皮, 一般只需1~2 min即可粘取大量表皮, 粘贴在胶带上的表皮被叶脉分割成大小不等的不规则小块, 面积一般在3~34 mm², 可以一次制作多个压片(图1、表1)。

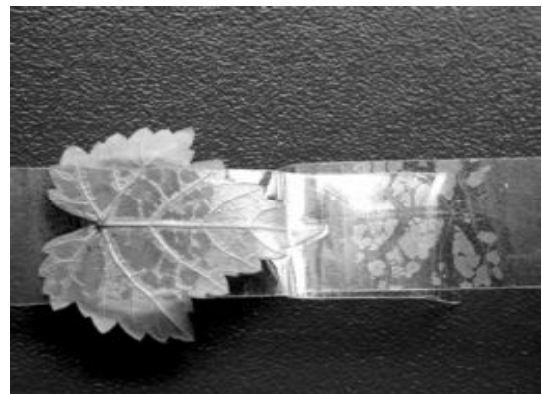


图1 塑料透明胶带粘取叶片的下表皮
实验材料为培养25 d的红地球葡萄试管苗叶片。

表1 不同气孔观察方法的综合指标分析

方法	制片所需时间/min ^个 ⁻¹	最大取样面积/mm ²	取样面积占叶面积的百分数/%	取样定位性	压片清晰程度	气孔真实性
胶带粘取下表皮法	1~2	34	70~80	好	高	好
撕取下表皮法	10~15	6	1~5	差	高	好
火棉胶印迹法	8~10	接近叶面积	80~100	好	低	差

材料为红地球葡萄试管苗。表2同。

取样面积(撕下的叶片表皮总面积或印迹总面积)和取样定位性在研究气孔分布规律时非常重要。取样面积占叶片面积的比值越大, 说明撕取表皮或印迹的能力越强, 在压片时对观察部位的选择余地越大, 越有利于叶片气孔的定位观察和研究。从表1可以看出, 火棉胶印迹法的取样能力和定位性最好, 基本可以达到全叶面任一部位的取样; 胶带粘取下表皮法次之, 取样面积可以达到叶面积的70%~80%, 取样定位性好; 而用镊子撕取下表皮的方法取样能力和定位性能最差, 取样面积一般只占叶片面积的1%~5%, 尤其是

幼嫩材料, 撕取下的下表皮都是随机的, 很难达到定位取样的目的。

压片的清晰程度和气孔的真实性对观察和研究结果有重要影响。用镊子撕取的表皮和用透明胶带粘取的表皮压片, 均能染色, 可清楚地看到气孔的结构和保卫细胞内的部分内含物质, 气孔的真实性和清晰程度高, 二者之间没有明显差异(图2-A、B); 而用火棉胶印迹法制作的切片, 只能反映气孔的基本轮廓和开闭状态, 切片的真实性和清晰程度差(图2-C)。

不同观察方法对气孔开张的横径、纵径和开

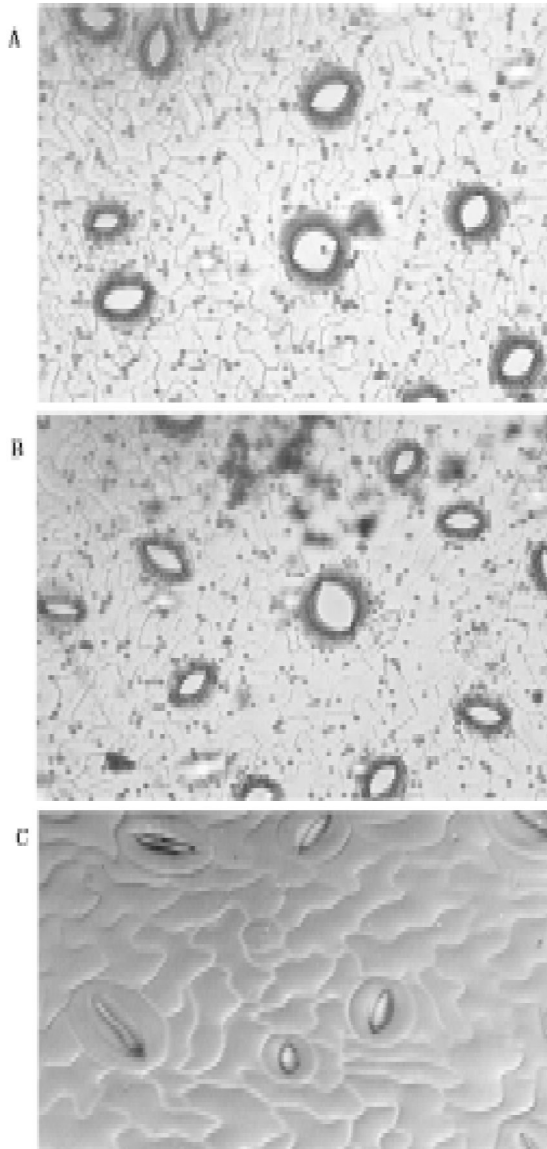


图2 不同方法得到的叶片下表皮压片(400×)

A. 透明胶带粘取法; B. 镊子撕取法; C. 火棉胶印迹法。A、B. 培养25 d的红地球葡萄试管苗叶片; C. 砂培炼苗40 d的红地球葡萄叶片。

张面积有较大的影响,尤其是对气孔开张的纵径和开张面积影响最为明显(表2)。用镊子直接撕取下表皮观察的气孔,横径、纵径和开张面积分别比用透明胶带粘取下表皮观察的气孔减小0.4%、6.4%和6.6%;而用火棉胶印迹法观察的气孔,横径、纵径和开张面积分别比用透明胶带粘取下表皮观察的气孔减小9.1%、24.3%和29.4%。

2 用透明胶带粘取不同材料下表皮的比较

用塑料透明胶带粘取不同植物叶片下表皮的

表2 不同观察方法对气孔开张度的影响

方法	气孔横径/ mm	气孔纵径/ μm	气孔开张面积/ μm ²
胶带粘取下表皮法	20.82	14.92	334.56
撕取下表皮法	20.74	13.96	312.71
火棉胶印迹法	18.93	11.29	236.23

难易程度,主要取决于叶片的幼嫩程度和表皮表面的洁净程度,而与植物种类之间差异较小(表3)。试管苗及其移栽驯化的砂培炼苗阶段,叶片组织幼嫩,保护组织不发达,叶片表面附着物少,用透明胶带很容易粘取叶片的下表皮。平均取样面积在3.2 mm²以上,取样的总面积占叶片面积的70%~80%,取样的定位性好,而且在表皮上粘着的叶肉细胞少,压片的清晰程度高。而对驯化以后在田间定植的一至二年生试管苗和在田间直接育苗定植的苗木,由于叶片保护组织发达,表面附着物多,叶片的成熟度高,粘取下表皮难度增大,往往需要多次粘取才能撕下表皮;对于成熟的功能叶,需要分割成3 mm×3 mm的小块(不带叶脉)才能用胶带粘取下表皮,而且取样的定位性较差,取样总面积只占叶片面积的30%左右,表皮粘着的叶肉细胞多,压片虽然能看到气孔的基本结构和分布情况,但清晰程度差。

讨 论

用塑料透明胶带粘取叶片下表皮观察植物的气孔,具有操作简单、速度快、真实性强的优点,尤其适宜于研究试管苗及其移栽驯化过程中气孔的变化动态和特性。试管苗由于组织幼嫩、气孔开张度大、保护组织不发达,叶片很容易失水萎蔫而导致气孔开张度减小。用塑料透明胶带粘取叶片的下表皮,不仅操作速度快,可以最大限度地减轻因失水导致的气孔开张度变化,而且表皮紧密地粘贴在胶带上,胶带对保卫细胞起到良好的固定作用,可以防止因保卫细胞失水而导致的气孔开张度的变化,有利于更真实地观察植物不同阶段和时期气孔的变化动态。

用火棉胶印迹法观察植物的气孔虽然不受材

表3 用透明胶带粘取不同材料下表皮的效果比较

材料种类		粘取下表皮 难易程度	平均取样面积/ mm ² 个 ⁻¹	取样面积占 叶面积百分数/%	取样 定位性 ¹⁾	表皮粘着 叶肉多少 ²⁾	压片 清晰程度 ³⁾
葡萄	试管苗	易	3.9	70~80	好	少	高
	砂培炼苗(40 d)	易	4.1	70~80	好	少	高
	田间定植苗	较难	2.3	20~30	较差	较多	较低
珠美海棠	试管苗	易	3.6	70~80	好	少	高
	砂培炼苗(40 d)	易	3.5	70~80	好	少	高
	田间定植苗	较难	1.9	20~30	较差	较多	较低
草莓	试管苗	易	3.2	70~80	好	较少	较高
香石竹	试管苗	极易	5.8	80~100	好	极少	高
甜瓜	田间定植苗	较难	2.6	20~30	较差	较多	较低
番茄	田间定植苗	较难	2.1	20~30	较差	较多	较低

1) 取样定位性: 定位撕取表皮的成功率大于70%为好, 50%~70%为较好, 50%以下为差。2) 表皮粘着叶肉多少: 粘着的叶肉面积占撕取表皮面积的2%以下为极少, 2%~5%为少, 5%~15%为较少, 15%以上为较多。3) 压片清晰程度: 主要受表皮上粘着叶肉细胞多少的影响, 叶肉细胞越多、越厚, 染色效果越差, 压片的清晰程度越低。

料种类的影响, 但胶的涂抹厚度往往难以很好地掌握, 在压片的时候, 容易出现胶膜偏厚、压片不平整、对比度低、清晰程度较差的缺点。另外, 由于在印迹时, 有一部分火棉胶扩散渗入到气孔内而产生印膜, 扩大了气孔的印迹范围, 在压片时, 扩展到气孔内的印膜被压平伸展, 导致观察时气孔的纵横径和开张面积变小。同时, 胶膜的收缩性强, 导致气孔印迹因胶膜的收缩变形而发生相应的变形, 使气孔的大小和开张度发生变化。因此, 在气孔大小、开张度等定量指标测定和研究方面, 准确性较低。这一方法只适宜于气孔基本形态和分布状况等定性指标的观察。而透明胶带则能很好地固定气孔, 且不发生变形, 很适宜于气孔形态学指标的定量研究。

参考文献

- 1 Downton WJS, Loveye BR, Grant WJR. Stomatal closure fully accounts for the inhibition of photosynthesis by abscisic acid. *New Phytol*, 1988, 108:263~266
- 2 Downton WJS, Loveye BR, Grant WJR. Non-uniform stomatal closure induced by water stress causes putative non-stomatal inhibition of photosynthesis. *New phytol*, 1988, 110:503~505
- 3 Farquhar GD, Sharkey TD. Stomatal conductance and photosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol*, 1982, 33:317~321
- 4 曹孜义, 李唯, 王希圣. 环境因素和 ABA 对葡萄试管苗气孔开闭的影响. *植物生理学报*, 1993, 19(4):372~378
- 5 西北农业大学植物生理生化教研组. *植物生理学实验指导*. 西安: 陕西科学技术出版社, 1987. 23~26
- 6 张守仁, 高荣孚. 介绍一种改进的研究气孔运动的方法. *植物学通报*, 1999, 16(1):89~92
- 7 张秀芳, 石东里, 张兰. 观察植物气孔结构的简易方法. *生物学通报*, 2002, 37(6):42