

## 技术与方法 Techniques and Methods

## 小液流法测定植物组织水势的优化

韦善君\*, 农钧琇, 马廷娟, 邹慧敏, 沈光涛, 戴景峰

中央民族大学生命与环境科学学院, 北京100083

**摘要:** 小液流法测定植物组织水势是植物生理学中的基础实验之一。本文从甲烯蓝的用量、实验材料的选择、取材方法和实验器材等方面进行优化, 建立了一套操作方便、可重复性好的小液流法测定植物组织水势的体系, 可用于实验教学和研究中。

**关键词:** 水势; 小液流法; 方法优化

## Improvement of Water Potential Measurement in Plant Tissue with Chardakov Method

WEI Shan-Jun\*, NONG Jun-Xiu, MA Ting-Juan, ZOU Hui-Min, SHEN Guang-Tao, DAI Jing-Feng

College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100083, China

**Abstract:** Water potential measurement in plant tissue with Chardakov method is one of the basic experiments in the plant physiology. In this study, we optimized the concentration of methylene blue, material selection, sampling method, and experimental equipments, and established a system of convenient operation and good repeatability, which could be used for experiment teaching and research.

**Key words:** water potential; Chardakov method; method optimization

水势是反映植物细胞和组织水分状态的重要水分生理参数之一, 诸多植物生理过程与水势变化密切相关。当水势低于 $-1$  MPa时, 叶片光合作用、气孔导度、蛋白质合成和细胞长大等生理生化过程均受抑制, ABA和溶质积累(Taiz和Eduardo 2009)。在高等院校植物生理学实验中, 植物组织水势的测定方法一般采用小液流法、露点法和压力室法等(张志良等2008)。其中, 小液流法测定植物组织的水势操作简单, 不需要精密仪器, 便于学生对水势概念的理解和掌握, 在实验教学中被广泛采用。

小液流法测定植物组织水势是基于液相平衡的原理。将植物组织置于一定浓度的外界溶液(通常是蔗糖水溶液)中, 水势的高低决定其水分的得失。当植物组织的水势大于外界溶液的水势时, 细胞失水, 外界溶液比重变小; 反之, 细胞吸水, 外界溶液的比重变大; 只有当植物细胞的水势与外界溶液的水势相等时, 植物细胞吸水 and 失水达到动态平衡, 外界溶液的比重基本保持不变。因此, 通过检测外界蔗糖溶液比重的变化就可以确定植物组织的水势。

用小液流方法测植物组织水势时, 甲烯蓝用

量、取材方法、实验器材的清洁和干燥程度、蔗糖溶液的均一性等因素都会影响实验结果(潘景美和陈宏愚1984; 黄久常和王邦锡1988; 陈秉初1991; 陈彦和朱奇2007; 石雪芹等2014)。在现有的植物生理学实验教材中甲烯蓝用量为“少许”, 学生不易掌握, 导致各处理用量不均一, 使实验结果重复性不好或无规律性。在取材上用“打孔器取叶圆片”的方法适用于宽大的双子叶植物片, 而不利于叶片面积较小的禾本科植物, 而且打孔器取材比较慢, 容易人为造成组织失水, 影响实验结果。在实验器材上, 教材中用的是青霉素瓶、毛细吸管, 实验前需要提前清洗并烘干, 毛细吸管还容易断, 补拉毛细管会增大实验准备的工作量。此外, 教材中也没有明确材料用量与实验结果的关系(张志良等2008)。

针对这些问题, 为了进一步提高实验的准确性和可重复性, 本研究从甲烯蓝用量、植物材料

收稿 2014-09-09 修定 2014-10-29

资助 国家自然科学基金(31100507)、中央民族大学本科生创新训练资助项目(URTP201411#2386)和中央民族大学生物技术专业综合改革试点项目。

\* 通讯作者(E-mail: wei.s.j@163.com; Tel: 010-68932633)。

选择及取材方案、实验器材等方面进行探讨, 得出了一套稳定可靠的方法, 可用于本科生实验教学和实验研究中。

## 材料与方法

### 1 植物材料及试剂

本实验以多年生禾本科草坪草——结缕草 (*Zoysia japonica* Steud.) (叶宽约4 mm)和三月龄的烟草(*Nicotiana tabacum* L.)为材料。烟草包括普通烟草和转*AtCBF1*基因表达的烟草2个株系。植物材料均培养于营养土、珍珠岩、蛭石的比例为2:1:1的基质中, 温室内培养, 温度25~28 °C, 光周期14 h·d<sup>-1</sup>。配制浓度范围为0.05~0.80 mol·L<sup>-1</sup>的蔗糖水溶液用于交换平衡, 并用各蔗糖溶液配制浓度为0.5~2.0 mg·mL<sup>-1</sup>的甲烯蓝母液。

### 2 甲烯蓝浓度和用量选择

根据预实验结果, 结缕草叶片等渗点小于0.1 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖溶液, 因而选该浓度进行实验。步骤如下: (1)取4个2 mL离心管, 各加入1 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup>的蔗糖溶液; (2)取10 mL洁净、干燥试管, 装入约2/3体积的0.1 mol·L<sup>-1</sup>的蔗糖溶液; (3)取结缕草直立茎上部第1~2片成熟叶, 去掉两端各约1 cm, 剪成长约0.5 cm的片段。取10个叶段, 分别加入到离心管中, 放置30 min, 期间多次摇匀。然后往离心管内加入不同量的甲烯蓝母液并混匀, 得到带指示剂的交换平衡溶液; (4)用微量移液器取5~10 μL的交换平衡溶液, 在小试管中部轻轻释放, 观察小液滴颜色及释放20 s的移动方向, 以确定适宜的甲烯蓝用量。

### 3 植物组织用量的确定

选用水势高于结缕草叶组织水势的0.06 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖溶液及其配制的甲烯蓝母液进行实验。结缕草叶组织用量为10、15、20、25、30、35和40个叶段, 实验操作参照上节所述, 观察交换平衡液滴移动方向, 并用秒表计蓝色液滴移动2 cm的时间, 计算速度。

### 4 改良小液流法测定结缕草和烟草植株叶组织水势

参考以上实验中确定的甲烯蓝用量和植物组织用量, 测定结缕草、非转基因烟草和转基因*AtCBF1*的烟草叶组织水势。结缕草取材同上节的方法。烟草取植株上部第3~4片展开叶, 避开中脉, 剪成约

4 mm×4 mm的小方片, 其他操作参照上节所述。

## 实验结果

### 1 甲烯蓝浓度对液滴走向的影响

0.1 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖溶液与结缕草叶组织进行交换平衡后, 加入不同量的甲烯蓝指示剂(表1), 溶液色度及液滴移动方向如图1所示。在1 mL交换平衡溶液中, 当加入5 μL浓度为0.5 mg·mL<sup>-1</sup>的甲烯蓝母液时, 液滴颜色不明显, 难以辨别其走向。当甲烯蓝母液增加至10 μL时, 液滴颜色可见, 液滴上移。当再增大甲烯蓝用量时, 液滴颜色更明显, 但液滴的走向转为下沉, 且随着甲烯蓝浓度的增加, 下沉速度加快。这说明甲烯蓝用量的增加, 加大了交换平衡液的比重。因此, 在保证实验现象可观察的前提下, 在1 mL的溶液中加入0.5 mg·mL<sup>-1</sup>甲烯蓝母液10 μL的效果较好, 即交换平衡溶液中甲烯蓝终浓度为5.0 μg·mL<sup>-1</sup>。

表1 甲烯蓝的用量

编号	母液浓度/mg·mL <sup>-1</sup>	母液用量/μL	终浓度/μg·mL <sup>-1</sup>
1	0.5	5	2.5
2	0.5	10	5.0
3	1.0	10	10.0
4	2.0	10	20.0

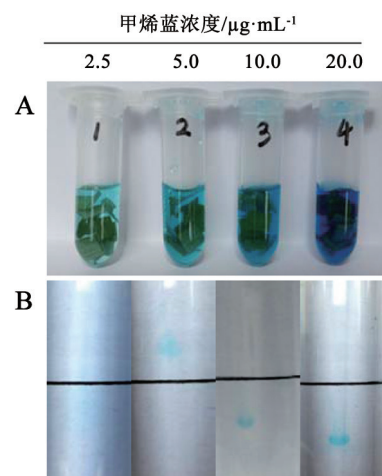


图1 含不同甲烯蓝浓度的交换平衡溶液的色度和液滴移动  
Fig.1 Chroma and droplets movements of sucrose solution with different concentrations of methylene blue

A: 溶液颜色; B: 液滴移动。

## 2 叶组织用量对液滴移动的影响

浓度为 $0.06 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蔗糖溶液与不同质量的叶组织进行交换平衡后,液滴均下沉,但液滴移动速度有差异(表2)。在1 mL的蔗糖溶液中加入10个叶段( $0.022 \text{ g}$ )时,液滴移动速度较慢;叶段用量在10~25个( $0.022\sim 0.061 \text{ g}$ )范围内,随着用量的增加,液滴移动速度递增,现象易于观察;当叶段用量为30个( $0.075 \text{ g}$ )以上时,有部分的材料难以被浸没,液滴移动速度也不再明显增加。说明增加叶组织用量不会改变液滴走向,适当增加用量,液滴移动速度加快,易于观察实验结果。

## 3 改良小液流法测定结缕草及烟草叶组织水势

采用改良小液流法,我们测定了结缕草叶组织的水势,使用的蔗糖溶液浓度为 $0.05\sim 0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。实验结果(表3)表明,当蔗糖浓度 $\leq 0.06 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,液滴下沉;当蔗糖浓度 $\geq 0.075 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,液滴均上漂。说明结缕草叶组织水势的等势点在 $0.06$ 与 $0.075 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖溶液之间,取两者平均值 $0.0675 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。根据 $\Psi_w = -iCRT$ 公式,其中 $i$ 为解离系数, $C$ 为溶液的摩尔浓度, $R$ 为摩尔气体常数, $T$ 为热力学

表2 叶组织数量对液滴移动速度的影响

Table 2 Effect of tissue quantity on the moving speed of droplets

叶段用量/个	叶组织质量/g	液滴移动速度/ $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$
10	0.022	0.02
15	0.034	0.03
20	0.046	0.06
25	0.061	0.16
30	0.075	0.18
35	0.084	0.18
40	0.093	0.20

表3 蔗糖溶液与结缕草叶组织交换平衡后液滴走向

Table 3 The movement of droplets in sucrose solutions after equilibrium with leaf tissue of *Z. japonica*

蔗糖溶液浓度/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	液滴走向
0.050	下沉
0.060	下沉
0.075	上漂
0.100	上漂
0.125	上漂
0.200	上漂

温度,计算得结缕草叶组织的水势约为 $-0.167 \text{ MPa}$ 。

采用同样的方法,我们测定了2个烟草株系叶组织水势。结果(表4)可见,对于普通植株,当蔗糖浓度为 $0.325 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,交换平衡液滴基本不动;浓度低时,液滴下沉;浓度高时,液滴上漂,说明该株系叶组织水势与 $0.325 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖溶液的水势相近,约为 $-0.804 \text{ MPa}$ 。对于转基因*AtCBF1*烟草株系,叶组织水势与浓度为 $0.375 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蔗糖溶液水势相近,为 $-0.928 \text{ MPa}$ 左右。

表4 蔗糖溶液与烟草叶组织交换平衡后液滴走向

Table 4 The movement of droplets in sucrose solution after balanced with tobacco leaf tissue

蔗糖溶液浓度/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	液滴走向及速度	
	非转基因烟草	转基因 <i>AtCBF1</i> 烟草
0.200	下沉	下沉
0.300	下沉	下沉
0.325	不动	下沉
0.350	上漂,缓慢	下沉,缓慢
0.375	上漂	不动
0.400	上漂	上漂
0.500	上漂,较快	上漂
0.600	上漂,较快	上漂,较快

## 讨 论

### 1 甲烯蓝的用量

甲烯蓝(CAS No.7220-79-3)为常用生物染色剂,分子量为373.90。在蔗糖溶液中加入甲烯蓝,若量少则溶液显色不明显,但量多时使溶液密度明显增大,影响实验测定结果。在诸多实验教材中,“加入甲烯蓝粉末少许”的一般做法是用大头针蘸取少量甲烯蓝粉末加入交换平衡溶液中。学生在实验操作中对“少许”不好控制,各处理中加入量不一致,整组实验液滴移动方向出现“下-上-下”的波浪式变化或全下沉,影响对所测植物组织水势的判定。本实验结果表明甲烯蓝终浓度为 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时起到较好的指示效果,终浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上时明显使溶液比重变大。在实验准备中可以用不同浓度的蔗糖溶液配制成 $0.5\sim 1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的甲烯蓝母液,然后用微量移液器按比例稀释到相应浓度的交换平衡溶液中,有效控制其用量,使实验结果呈现较好的规律性。

## 2 植物材料选择及取材方法

打孔法取植物叶圆片适用于叶子较大的双子叶植物,而且打孔过程较慢,容易人为造成组织失水,各处理取样时间不一样时组织失水程度也不同,使得实验结果无规律。针对这些问题,有的教师用土豆切片为材料,取得较稳定的实验结果(石雪芹等2014)。本实验中,我们以禾本科植物结缕草为材料,用剪刀取同龄叶片并快速剪成长约5 mm的片段,然后等量分配到各蔗糖溶液中进行交换平衡,实验结果规律性很好。该取材方法用于双子叶植物烟草,也取得良好的结果。在教学中建议培养小麦、玉米和水稻等单子叶植物幼苗作为材料,该类幼苗易培养,材料新鲜,均一性好。此外,自己培养植物材料时,还可以增加一些设计性的内容,比如对植物进行低温、高盐或干旱的胁迫处理,比较正常和逆境胁迫下叶组织的水势差异,促进学生对植物水势与环境关系的思考。

在实验教材中,植物组织的用量为4 mL蔗糖溶液中加入5~8个叶圆片,植物组织用量的多少对实验结果的影响没有提及。黄久常和陈宏愚(1988)曾研究报道,用1~2片直径约7 mm的叶圆片与50  $\mu$ L(即1滴)溶液进行交换,也取得较好的效果,还可节约植物材料。但是在如此微量的交换平衡溶液中,需要严格控制指示剂用量,否则实验结果误差很大。在实验中我们观察到,植物组织的用量不影响液滴的移动方向,适当增加用量可提高液滴移动速度。在实验材料允许条件下,1 mL的蔗糖溶液中叶组织用量以0.06 g左右为宜,释放液滴后30 s左右可确定其移动方向(表2和3)。如果加入植物材料过多,组织不能被蔗糖溶液完全浸没,不利于振荡混匀,也造成材料浪费。

## 3 实验器材的选用

在实验器材上,传统的方案是在青霉素瓶中进行组织和溶液的交换平衡,然后用玻璃毛细管取液滴检测其比重变化。在本实验中,我们采用2 mL的离心管代替青霉素瓶,用10  $\mu$ L的移液器代替胶头毛细管,取得了良好的效果。2 mL离心管和10  $\mu$ L的移液枪头均为一般实验耗材,洁净和干

燥度好,使用方便,还可以有效减少实验误差,提高精确度。

采用以上优化以后的实验方案,我们测得结缕草叶组织水势约为-0.167 MPa,转基因*AtCBF1*烟草和非转基因烟草叶组织的水势分别为-0.928和-0.804 MPa。结缕草叶组织水势较低,可能与其组织纤维化程度高、代谢不活跃相关。*AtCBF1*是拟南芥逆境胁迫响应转录因子之一,超表达该基因的转基因烟草(韦善君等2005)、番茄(Hsieh等2002)、拟南芥(Cook等2004)植株中脯氨酸、可溶性糖等渗透调节物含量显著高于非转基因株系,植株抗逆性增强。表达*AtCBF1*植株叶片水势低于非转基因株系,与文献报道的转基因株系渗透调节物浓度高的结果相符。我们的实验结果证明,优化以后的小液流法测植物组织水势的方法,操作简单易行,实验结果稳定,规律性好,不仅可用于实验教学,还可用于实验研究中。

## 参考文献

- 陈秉初(1991). 小液流法测定植物组织水势实验的探讨. 实验室研究与探索, (4): 92~93
- 陈彦, 朱奇(2007). 植物组织水势测定实验的改进. 植物生理学通讯, 43 (1): 153~154
- 黄久常, 王邦锡(1988). 小液流法测定植物水势的改进试验. 植物生理学通讯, (5): 57~58
- 潘景美, 陈宏愚(1984). 关于用“小液流法”测定植物组织水势的改进意见. 植物生理学通讯, (3): 75~76
- 石雪芹, 朱晔荣, 赵念席, 沈广爽(2014). “小液流法”测定植物组织水势实验教学的改进. 实验室科学, 17 (1): 42~43, 46
- 韦善君, 孙振元, 巨关升, 韩蕾, 余龙江(2005). 冷诱导基因转录因子CBF1的组成型表达对植物的抗寒性及生长发育的影响. 核农学报, 19 (6): 465~468
- 张志良, 瞿伟菁, 李小芳主编(2008). 植物生理学实验指导. 第4版. 北京: 高等教育出版社, 7
- Taiz L, Eduardo Z (2009). 宋纯鹏, 王学路译. 植物生理学. 第4版. 北京: 科学出版社, 41
- Cook D, Fowler S, Fiehn O, Thomashow MF (2004). A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA, 101: 15243~15248
- Hsieh TH, Lee J, Charng Y, Chan MT (2002). Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. Plant Physiol, 130: 618~626