

技术主题

Technology Feature

棉花叶片气孔制片方法比较及改良

叶春秀 庄振刚 李有忠 谢宗铭*

新疆农垦科学院分子农业技术育种中心, 作物种质创新与基因资源利用兵团重点实验室, 石河子, 832000

* 通讯作者, xiezmchy@163.com

摘要 为了快速制作适合光学显微镜下观测的棉花叶片气孔切片, 本研究采用不同方法对棉花叶片气孔进行切片制作, 观察气孔的形态、数量、长度、宽度等形态特征。结果表明: 用指甲油涂抹印迹法、透明胶带粘贴法都能够得到不同清晰程度的气孔切片, 但这两种方法在操作过程中存在着撕取难、易移位等缺点。本研究针对以上缺点对两种方法进行了综合改进, 改进后的综合法能够克服撕取难和易移位的不足, 更快速地得到清晰的棉花叶片气孔切片, 为棉花及其它植物叶片气孔切片制作提供了方法和技术支持。

关键词 棉花叶片, 气孔, 切片, 方法, 改良

A Comparison of Several Specimen Preparation Methods of Cotton Stomatal Slice

Ye Chunxiu Zhuang Zhengang Li Youzhong Xie Zongming*

Center for Molecular Agrobiotechnology and Breeding, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Sciences, Xinjiang Production & Construction Group Key Laboratory of Crop Germplasm Enhancement and Gene Resources Utilization, Shihezi, 832000

* Corresponding author, xiezmchy@163.com

DOI: 10.13271/j.mpb.012.000543

Abstract In order to develop a simple and fast stomatal slice preparation technique, different methods were used to prepare stomatal slice of *Gossypium hirsutum* L. for observation of its morphological features, such as number, length, width and so on. The result showed that different methods can obtain some level of definition of leaf stomatal structure. Compared with other methods, synthetic method could get more clear specimens than other methods with simplicity of operation, rapidity and suitability for other plants, it provides a technique support for stomatal slice production of other plant species.

Keywords Cotton leaves, Stomatal slice, Methodology, Cotton

气孔是植物叶片与外界环境进行气体交换的重要通道, 其形状、密度等形态特征与植物的光合作用、蒸腾作用及抗逆性(抗旱, 抗寒, 抗盐碱)等关系密切, 研究植物叶片气孔特征对了解植物的抗逆性等方面具有重要意义(Hetherington and Woodward, 2003; 李润唐等, 2004; 李美善等, 2012; 李映辉等, 2013; 王曙光等, 2013)。通常采用不同的方法对植物叶片进行气孔切片制作, 研究气孔的特征, 进而分析植物的抗旱性(于海秋等, 2003), 如指甲油印迹法(刘明智等, 2005, 生物学通报, 40(10): 44)、透明胶带印迹法(梁

维等, 2009)、直接撕取法(梁维等, 2009)、刮制类(段云峰等, 2008)等方法(杨芳和蒲训, 2010)。通过采用这几种方法在棉花叶片气孔制作过程中进行尝试, 发现对于棉花类叶片表面存在附属物(绒毛, 腺体等)的植物来说, 这几种方法在操作、清晰度等方面或多或少存在不足。因此, 获得一种易于操作、有效的棉花叶片气孔切片制作方法具有重要意义。

本研究通过比较、综合和改进这几种切片制作方法, 分析和观察切片的制作效果, 获得一种快速且有效的棉花叶片气孔制作方法—综合法, 为从气孔

形态、结构特征方面研究棉花抗旱性提供了一种便捷、快速的方法和技术支持。

1 结果与分析

1.1 不同制片方法制片效果比较

图 1 是采用 4 种方法制作的棉花叶片气孔切片,由图可以看出,这几种方法都能够得到不同清晰程度的叶片气孔切片。其中,直接撕取法(图 1A)获得的切片容易带上其它的组织,不利于观察;透明胶带法(图 1B)在操作过程中易移位,获得的切片清晰度不够,不利于气孔形态的观察;指甲油印迹法(图 1C)制作的切片能够利于观察,但撕取难度较大;综合法(图 1D)相比其它方法能够获得清晰的棉花叶片气孔切片,而且撕取容易,利于气孔形态特征、数量的观察及操作。

1.2 不同制片方法比较及改进

在叶片气孔制片过程中,直接撕取法、指甲油印迹法、透明胶带粘贴是常用的制片方法,但在棉花叶片气孔的制作过程中都存在一些缺点,棉花叶片分布着腺体、绒毛,直接撕取法不容易得到单层完整的表皮细胞,易出现多层细胞重叠的现象,影响了气孔制片清晰度和完整性的观察(图 1A);透明胶带法

相比直接撕取法能够容易得到完整的制片,但存在着容易移位、不清晰的现象(图 1B);指甲油印迹法相比前两种方法能够得到更清晰的气孔制片,有利于气孔数量及相关形态的观察(图 1C),但其在操作过程中如果指甲油层太薄,则不易撕取,易产生褶皱,改变气孔的形态等特征,增加指甲油层厚度易撕取,但影响切片清晰度,不利于气孔特征的操作,制片时间也会延长。

针对指甲油印迹法和透明胶带粘贴法操作过程中存在的问题,对这两种方法进行了综合、改进,制片制作的开始过程采用指甲油印迹法进行,撕取的过程中采用透明胶带粘贴指甲油层撕取,发现这样克服了指甲油印迹法撕取困难的缺点,而且只需要涂抹一层指甲油就可以轻易地撕取,而不会改变气孔的形态特征,将其粘贴在载玻片上,不需要覆盖盖玻片进行观察,就可以得到清晰的叶片气孔制片(图 1D),不受叶片表面附属物的影响(图 2A),整个制片过程只需要 5~10 min,制片效率较高,棉花叶片表面气孔状态及一些特殊特征的观察、测定也无影响(图 2B; 图 2C; 图 2D)。

2 讨论

通过比较常用的叶片气孔制片方法和改进的综合法,发现综合法相比其它几种方法能够得到更加

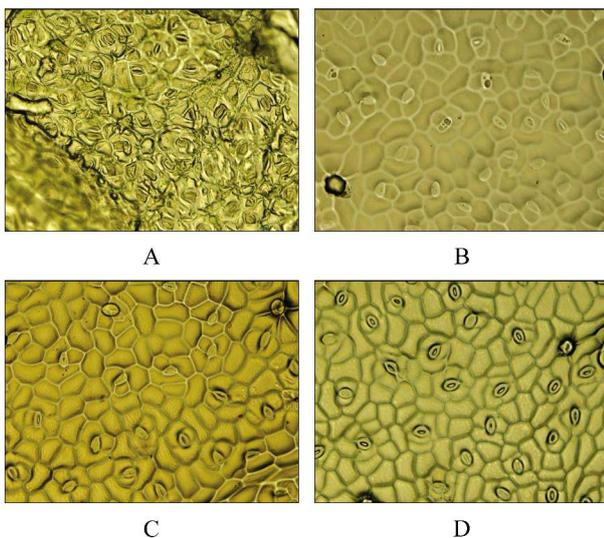


图 1 4 种不同方法切片制作效果比较图(放大倍数为 10×20 倍)
注: A: 直接撕取法; B: 透明胶带粘贴法; C: 指甲油印迹法; D: 综合法

Figure 1 Compare the leaf epidermal prepared with four different methods (Magnification 10×20)

Note: A: Direct peeling method; B: Transparent adhesive tape sticking method; C: Nail polish blotting method; D: Synthetic method

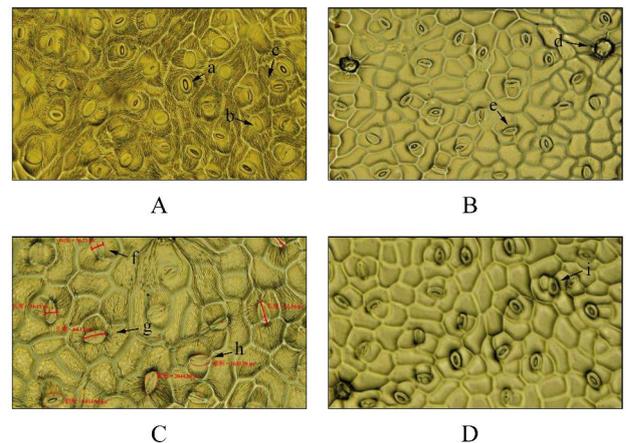


图 2 综合法制作叶片气孔切片形态图(放大倍数为 10×20 倍)
注: A~D: 采用综合法制作棉花叶片气孔切片观察到的不同特征; a: 气孔开放; b: 气孔关闭; c: 叶片表面绒毛; d: 腺体; e: 气孔; f: 气孔宽度测量; g: 气孔长度测量; h: 气孔面积测量; i: 双气孔

Figure 2 Leaf epidermal prepared with Synthetic method

Note: A~D: Different characters of cotton leaf epidermal prepared with Synthetic method; a: Stomatal opening; b: Stomatal closed; c: Hair of leaves; d: Gland; e: Stomatal; f: Width of Stomatal; g: Length of Stomatal; h: Area of stomatal; i: Double stomatal

清晰的棉花气孔切片,如图 1 所示,更加细致地观察到了叶片表面的附属物(绒毛)、气孔状态(开、关),并且对气孔其它结构特征(长度、宽度、面积等)的测定也无影响(图 2),这是其它方法制作的切片很难观察到的;另一方面,综合法相比其它制作方法最大的优点是操作过程更加容易,特别对于叶片表面具有附属物的植物来说更加容易撕取,获得理想的叶片气孔切片,对于研究棉花的抗逆性具有重要意义。通过在棉花叶片上的实际操作,发现综合法能够成功用于棉花叶片气孔切片制作,同时也为其它植物叶片气孔制作提供了借鉴信息。

3 材料和方法

3.1 材料及预处理方法

供试材料是新陆早系列品种叶片,采自新疆农垦科学院分子农业技术育种中心试验地,采花铃期功能叶片-倒 4 叶。叶片取回后迅速制片,先用流水冲洗,去除表面浮尘,然后用蒸馏水冲洗两遍,晾干进行切片制作。

3.2 切片制作方法

3.2.1 直接撕取法

用镊子在棉花叶片上直接撕取上表皮的细胞,将撕取的细胞平展在滴有水的载玻片上,盖上盖玻片在荧光显微镜(Nikon)下进行观察。

3.2.2 指甲油印迹法

参照刘明智等(刘明智等, 2005, 生物学通报, 40(10): 44)的方法制作棉花叶片气孔切片:分别取棉花叶片正面、背面无叶脉的部位,均匀涂抹一层指甲油,在室温将指甲油晾干,大约 5~10 min,用镊子撕取指甲油层,然后将指甲油与叶片接触的一面放入滴有丙三醇的载玻片上,轻轻盖上盖玻片,用手指轻压盖玻片,用滤纸吸取多余的丙三醇,将气泡挤压出盖玻片,制成临时气孔切片,观察方法同 1.2。

3.2.3 透明胶带粘取法

参照梁维等(2009)的桑叶气孔制片方法:分别取棉花叶片正面、背面无叶脉的部位,用透明胶带胶面粘取,用手指轻压胶带,使其与叶片充分接触,然后撕取透明胶带,将胶面粘贴在载玻片上,直接进行观察,观察方法同 1.2。

3.2.4 切片制作方法的改进(综合法)

在采用以上几种方法制作棉花叶片气孔切片,

发现由于棉花叶片上存在一些腺体和绒毛,几种方法在制作过程中都不太容易撕取表皮或指甲油层,所以对指甲油印迹法、透明胶带粘取法进行了综合改进,简称综合法,过程如下:将指甲油均匀涂抹在棉花叶片正面、背面的取材部位,使其在室温自然晾干 5~10 min(受光照、风等影响,晾干所需时间不一样),将塑料透明胶带拉开 3~4 cm,胶面朝下,粘取指甲油层,用手指抹平胶带,使胶带与指甲油层之间充分接触,没有气泡存在,撕取粘有指甲油层的胶带,将其粘贴在载玻片上,不用盖玻片在荧光显微镜(Nikon)下直接观察。

作者贡献

叶春秀是本研究的实验设计和实验研究的执行人,完成实验操作、数据分析及论文初稿的写作;庄振刚参与实验材料的采集和处理;李有忠参与实验材料的种植和管理;谢宗铭是项目的构思者及负责人,指导实验设计,数据分析,论文写作与修改。全体作者都阅读和同意最终的文本。

致谢

本研究由兵团生物种质资源专项(2012BD046)和新疆农垦科学院科技引导计划项目(41YYD201201)共同资助。感谢项目组成员在试验操作与论文撰写过程中给予的建议和帮助。

参考文献

- Duan Y.F., Wang Y.N., and Li X., 2008, A simplified method for observing stomata by shaving of Mescophyll cells to obtain epidermis from leaf and its application, *Huabei Nongxuebao (Acta Abriculturae Boreali-sinica)*, 23(6): 73-76 (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(6): 73-76)
- Hetherrington A.M., and Wood ward F.I., 2003, Theory leaf stomata in sensing and driving environmental change, *Nature*, 424: 901-908
- Li M.S., Liu X.H., Wu W.L., An J.H., and Xu M.Z., 2012, Comparative study on stomatal characteristics of *Rhodiola Sachalinensis* A. Bor grown in different regions, *Yanbian Daxue Nongxue Xuebao (Journal of Agricultural Science Yanbian University)*, 34(4): 299-303 (李美善, 刘宪虎, 吴委林, 安金花, 许明子, 2012, 不同地区高山红景天叶片气孔特性比较研究, *延边大学农学学报*, 34(4): 299-303)
- Li R.T., Zhang Y.N., and Tian D.L., 2004, Studies on the stomata of citrus plant leaves, *Guoshu Xuebao (Journal of Fruit Sci-*

- ence), 21(5): 419-424 (李润唐, 张映南, 田大伦, 2004, 柑橘类植物叶片的气孔研究, 果树学报, 21(5): 419-424)
- Li Y.H., Li R.T., Wu D., Zou X.J., and Ye C.H., 2013, Studies on relationship between stomata and cold resistance of 3 pineapple cultivars, *Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agricultural Science)*, 41(1): 1-3 (李映晖, 李润唐, 吴钊, 邹雪娟, 叶昌辉, 2013, 3个菠萝品种叶片气孔特征及其与抗寒性的关系, *安徽农业科学*, 41(1): 1-3)
- Liang W., Yang X.H., Cheng J.Y., and Zhou Z.Q., 2009, A comparison of several specimen preparation methods for light microscopic observation of mulberry leaf epidermis, *Canye Kexue (Science of Sericulture)*, 35(1): 116-120 (梁维, 杨晓红, 陈吉裕, 周志钦, 2009, 几种用于光学显微镜观测的桑叶表皮整体制片方法比较, *蚕业科学*, 35(1): 116-120)
- Wang S.G., Li Z.Q., Jia S.S., Sun D.Z., Shi Y.G., Fan H., Liang Z.H., and Jing R.L., 2013, Relationships of wheat leaf stomatal traits with wheat yield and drought-resistance, *Yingyong Shengtai Xuebao (Chinese Journal of Applied Ecology)*, 24(6): 1609-1614 (王曙光, 李中青, 贾寿山, 孙黛珍, 史雨刚, 范华, 梁增浩, 景蕊莲, 2013, 小麦叶片气孔性状与产量和抗旱性的关系, *应用生态学报*, 24(6): 1609-1614)
- Yang F., and Pu X., 2010, Study on angiosperm leaf stomatal production, *Xiandai Nongye Keji (Modern Agricultural Science)*, (22): 33-37 (杨芳, 蒲训, 2010, 被子植物叶片气孔制片方法研究, *现代农业科技*, 22: 33-37)
- Yu H.Q., Wu Z.H., Shen X.Y., and Xu K.Z., 2003, Change of stomatal density, length, width and microstructure of maize leaves under water stress, *Jilin Nongye Daxue Xuebao (Journal of Jilin Agricultural University)*, 25(3): 239-242 (于海秋, 武志海, 沈秀瑛, 徐克章, 2003, 水分胁迫下玉米叶片气孔密度、大小及显微结构的变化, *吉林农业大学学报*, 25(3): 239-242)

欢迎订阅 2014 年《中国种业》

全国中文核心期刊 全国优秀农业期刊

《中国种业》是由农业部主管, 中国农业科学院作物科学研究所和中国种子协会共同主办的全国性、专业性、技术性种业科技期刊。

刊物目标定位: 以行业导刊的面目出现, 并做到权威性、真实性和及时性。覆盖行业范围: 大田作物、蔬菜、花卉、林木、果树、草坪、牧草、特种种植、种子机械等, 信息量大, 技术实用。

读者对象: 各级种子管理、经营企业的领导和技术人员, 各级农业科研、推广部门人员, 大中专农业院校师生, 农村专业户和广大农业生产经营者。

月刊, 大 16 开, 每期 8 元, 全年 96 元。国内统一刊号: CN 11-4413/S, 国际标准刊号: ISSN 1671-895X, 全国各地邮局均可订阅, 亦可直接汇款至编辑部订阅, 挂号需每期另加 3 元。邮发代号: 82-132

欢迎投稿、刊登广告

地 址: 北京市中关村南大街 12 号 中国种业编辑部(100081)
电 话: 010-82105796(编辑部) 010-82105795(广告发行部)
传 真: 010-82105796 网址: www.chinaseedqks.cn
E-mail: chinaseedqks@sina.com chinaseedqks@163.com