

过氧乙酸离析法观测蓝靛果忍冬叶片脉序的方法研究

徐清华¹, 吴旭飞¹, БРЫКСИН Д. М.², 张雪霞¹, 李富恒

(1. 东北农业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 俄罗斯米丘林园艺研究所, 坦波夫州米丘林斯克市 393774)

摘要:过氧乙酸离析法主要用于植物叶片表皮的观测,也可用于叶片脉序的观测,操作简单实用。为获得适于蓝靛果忍冬叶片脉序观测的最佳组合,以蓝靛果忍冬叶片为材料,采用单因素试验和正交试验对过氧乙酸浓度、水浴温度、水浴时间的处理条件进行了系统的研究。结果表明:在70℃水浴中用12%的过氧乙酸处理蓝靛果忍冬叶片3.5 h或用14%的过氧乙酸溶液在60℃水浴中处理3.5 h,得到的装片脉序观测效果最佳。

关键词:蓝靛果忍冬; 叶片; 过氧乙酸离析法; 脉序; 正交试验

中图分类号:S663.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)03-0080-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.03.0080

叶脉由贯穿在叶肉内的维管束或维管束及其外围的机械组织组成,是叶内的输导组织和支持结构。叶脉在叶片中呈有规律地分布,通过叶柄与茎内的维管组织相连^[1]。脉序是叶片中叶脉分布的类型,是植物分类的重要依据^[2]。脉序观测方法主要以氢氧化钠离析法^[3]、次氯酸钠离析法^[4]为主,过氧化氢-醋酸离析溶液也可用于植物叶片脉序的制片^[5],离析后获得的叶片材料柔韧度好且观测效果清晰,既可用于临时观察,又可用做成永久装片,但此方法在脉序观测方面的应用研究较少。有关离析法用于叶片脉序观测的研究多是针对双子叶草本植物的^[6-7],而以双子叶木本植物蓝靛果忍冬为材料的研究却鲜有报道。每一种方法随着植物种类的不同处理条件有较大差异^[8-9]。过氧乙酸是一个混合物,含有乙酸及过氧化氢等物质,能够使叶肉细胞的胞间层溶解,使叶肉细胞分离,还具有漂白作用,故可用于植物叶片脉序的观测。本文以蓝靛果忍冬叶片为材料,采用单因素和正交试验设计对过氧乙酸离析法中的各种条件进行了系统的研究,以期获得适合蓝靛果忍冬叶片脉序观测的最佳方法,为科研和教学工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为蓝靛果忍冬启明星(Зарница)品种的成熟叶片,取自中国科学院东北地理与农业生态研究所试验田。

1.2 方法

1.2.1 单因素试验设计 对可能影响过氧乙酸离析法观测效果的过氧乙酸浓度、水浴温度及水浴时间这3个因素先进行单因素试验,以初步筛选出适宜范围。

各个单因素的水平设计:过氧乙酸浓度(%):2、6、10、14;水浴温度(℃):20、40、60、80;水浴时间(h):2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0。

在进行处理蓝靛果叶片的某一单因素试验时,其它各因素的水平取值固定为:过氧乙酸浓度12%,水浴温度60℃,水浴时间3.5 h。

1.2.2 正交试验设计 在单因素试验筛选出的各个因素范围基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行三因素三水平的正交试验,根据试验结果筛选出最优组合。

1.2.3 叶片脉序装片的制取 将蓝靛果忍冬叶片剪切成约1 cm×1 cm的小块。按照单因素和正交试验设计,将叶片小块放入装有过氧乙酸溶液的试管中,置于水浴锅中加热处理一定时间。用镊子将处理好的叶片从试管中取出,放在载玻片上,蒸馏水冲洗3~5次后,对离析后的叶片染色30 min。用蒸馏水冲洗掉叶片上及其周围的余液,滴加一点蒸馏水,盖上盖玻片,在显微镜下

收稿日期:2015-12-16

基金项目:黑龙江省教育厅资助项目(12531013)

第一作者简介:徐清华(1989-),女,山东省菏泽市人,在读硕士,从事植物生理研究。E-mail:1272636460@qq.com。

通讯作者:李富恒(1962-),男,博士,教授,从事植物生理学的教学和科研工作。E-mail:lifuheng1963@126.com。

观察获取的脉序效果并进行显微摄影。

2 结果与分析

2.1 影响过氧乙酸离析法脉序观测效果的单因素试验结果分析

2.1.1 过氧乙酸浓度 由表 1 可知,用 10%和 14%的过氧乙酸溶液处理叶片,叶片柔韧性好,得到的装片观测效果最好(图 1-a);6%的过氧乙酸浓度处理叶片柔韧性好,有少量叶肉细胞未被清除干净,观测效果良好;2%的过氧乙酸浓度处理叶片有大量叶肉细胞残留,严重影响观测效果。

表 1 不同过氧乙酸浓度下的脉序观测效果

Table 1 Observations effect of different concentration of the peroxyacetic acid

浓度/% Concentration	2	6	10	14
观测效果 Observations effect	D	B	A	A

A:优; B:良; C:中; D:差。下同。
A: Excellent; B: Good; C: Average; D: Poor. The same below.

2.1.2 水浴温度 由表 2 可知,在 50℃和 70℃水浴温度条件下观测效果最好,叶片柔韧性好,观测效果优(图 1-b);当水浴温度为 90℃时,观测效果中等,叶片柔韧性差,容易破碎;水浴温度为 30℃的处理虽叶片柔韧性好,但叶片中有许多叶肉细胞残留,在显微镜下不能清晰地观测各级脉序,观测效果差。

2.1.3 水浴时间 由表 3 可知,当水浴时间为 3.5~4.5 h 时,叶片柔韧性较好,得到的装片观测效果最好(图 1-c);水浴处理叶片 5 h,在显微镜

下观测效果良好,但叶片柔韧性差,不利于操作;水浴处理叶片 3 h,叶片柔韧性好,但有少量叶肉细胞残留,观测效果中等;水浴处理叶片 2.5 h,叶片柔韧性较好,但有大量叶肉细胞残留,观测效果差。

表 2 不同过氧乙酸水浴温度下的脉序观测效果

Table 2 Observations effect of different water-bath temperature of the peroxyacetic acid

水浴温度/℃	30	50	70	90
Water-bath temperature				
观测效果	D	A	A	C
Observations effect				

表 3 不同过氧乙酸水浴处理时间下的脉序观测效果

Table 3 Observations effect of different water-bath time of the peroxyacetic acid

水浴时间/h	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
Water-bath time						
观测效果	D	C	A	A	A	B
Observations effect						

综合以上单因素试验结果,初步得出各个因素的适宜取值范围为过氧乙酸浓度 10%~14%、水浴温度 50~70℃、水浴时间 3.5~4.5 h。

2.2 优化蓝靛果忍冬叶片脉序观测条件的正交试验

在单因素试验结果的基础上,确定各因素的大致适用范围,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行三因素三水平的正交试验,进一步优化筛选出最佳的处理组合,结果见表 4。

表 4 蓝靛果忍冬叶片观测条件正交试验结果

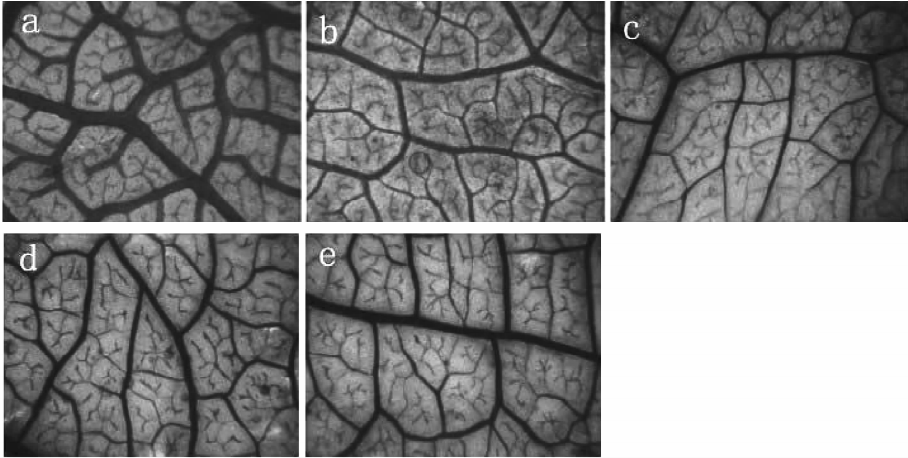
Table 4 The result for observing *Lonicera caerulea* leafs condition of the orthogonal experiment

处理	水浴温度/℃	过氧乙酸浓度/%	水浴时间/h	观测效果
Treatments	Water-bath temperature	Concentration of the peroxyacetic acid	Water-bath time	Observations effect
1	50	10	3.5	D
2	50	12	4.0	B
3	50	14	4.5	C
4	60	10	4.0	B
5	60	12	4.5	C
6	60	14	3.5	A
7	70	10	4.5	B
8	70	12	3.5	A
9	70	14	4.0	C

由表 4 可知,在正交试验中,处理组合 6(图 1-d)和组合 8(图 1-e) 观测效果最好,且柔韧性

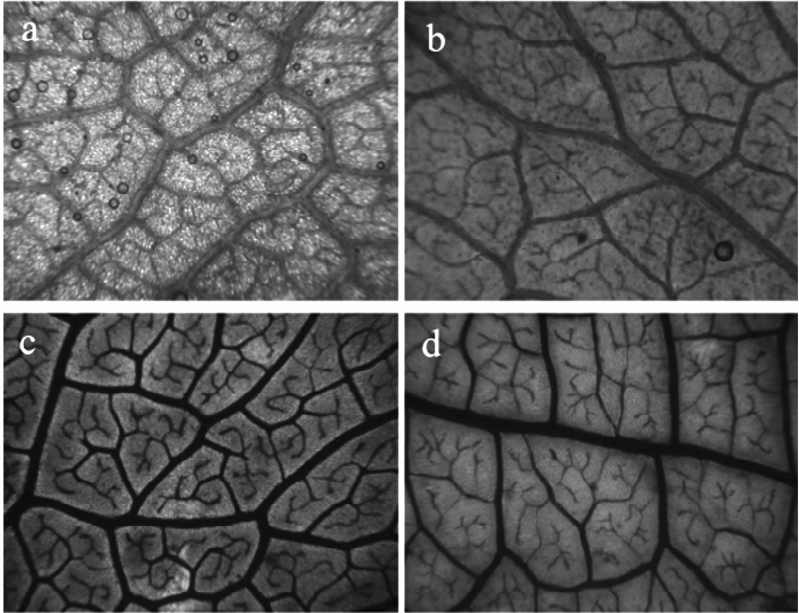
好;组合 2、4 和 7 观测效果良好但柔韧性稍差;组合 3、5 和 9 观测效果中等,但柔韧性较差,在操作

中易碎;组合 1 叶片有微量叶肉细胞残留,观测效 果差。



a~c 为单因素试验结果图;其中 a 为 10%过氧乙酸溶液处理叶片获取的脉序图;b 为 50℃ 水浴处理叶片获取的脉序图;c 为水浴处理叶片 4 h 后获取的脉序图。d~e 为正交试验结果;其中 d 为处理组合 6 获取的脉序图;e 为处理组合 8 获取的脉序图。
a~c are the result map of single factor experiment: a is the venation graph of leaf under the treatment of 10% peracetic acid aerosol; b is the venation graph of leaf in 5℃ water-curing condition; c is the venation graph of leaf in 4 h water-curing condition. d~e are the orthogonal test results: d is the venation graph of the sixth treatment combination; e is the venation graph of the eighth treatment combination.

图 1 过氧乙酸离析法观测蓝靛果忍冬脉序的效果,100×
Fig. 1 The observation effects of the *Lonicera caerulea* nervation treated by peroxyacetic acid maceration



a 为氢氧化钠离析法处理叶片获取的脉序图;b 为次氯酸钠离析法处理叶片获取的脉序图;c 为改良后的次氯酸钠离析法处理叶片获取的脉序图;d 为过氧乙酸离析法处理叶片获取的脉序图。
a is the venation graph of leaf treated with the sodium hydroxide segregation method; b is the venation graph of leaf treated with the sodium hypochlorite segregation method; c is the venation graph of leaf treated with the modified sodium hypochlorite segregation method; d is the venation graph of leaf treated with the peracetic acid segregation method.

图 2 蓝靛果忍冬叶片脉序不同制片方法的效果,100×
Fig. 2 The mounting effect of nervation from *Lonicera caerulea* by using different methods

由图 1 可以观察到,蓝靛果忍冬叶片具有网状脉序,根据叶脉的粗细和发育的先后顺序可把叶脉分为 5 级,相应的由各级叶脉形成的脉岛也可以分为 5 级,整个叶片是由各级叶脉围成的各级脉岛构成的。中脉只有一个,它将叶片分为左右两部分,所以一级脉岛只有两个。二级叶脉的数量也不多,二级脉岛的数量比二级叶脉的数量多两个。利用各级脉岛面积的测量数据,可以计算三、四、五级叶脉和脉岛的数量。前三级叶脉长和脉岛面积可以直接在新鲜叶片上测量;四、五级叶脉长和脉岛面积要先把叶片脱色,再在显微镜下测量。对双子叶植物叶片网状叶脉各级叶脉和脉岛量化研究有利于揭示双子叶植物网状脉和叶片形成的机理。

3 结论与讨论

离析类方法主要原理是是利用化学试剂将叶片叶肉细胞的胞间层溶解,使叶肉细胞分离,达到表皮与叶肉分离的目的。离析方法有多种,如次氯酸钠法、过氧化氢-醋酸法、铬酸-硝酸法、碳酸钠法、氢氧化钠法等,主要用于叶片表皮及气孔的观测,其中应用较多的是次氯酸钠法^[4,10],目前观测脉序应用较多的也是此法,但多需要与其它试剂配合使用才能获得理想的制片效果。过氧化氢-醋酸法常用来离析木质材料,在叶片表皮的观测中仅见少数学者使用^[11-12];孙同兴^[5]等对此方法进行了简单探究,发现过氧化氢-醋酸法作用比较温和,离析时间和温度易于控制,更为重要的是离析过程不会破坏所要观察的表皮结构;在过去研究工作的基础上,将此方法用于脉序的观测也可获得理想的装片。

叶片脉序的制片方法很多,本文对不同制片方法的效果进行了比较,结果表明,氢氧化钠离析法(图 2-a)及次氯酸钠离析法(图 2-b)制片的观测效果较差;改良后的次氯酸钠离析法(氢氧化钠和次氯酸钠两种试剂同时使用)可获得柔韧性较好且观测清晰度较高的装片(图 2-c),但此法操作复杂,不同种类植物要求的离析条件不尽相同,影响因素较多,离析时间和温度不易于控制,工作量较大;过氧乙酸离析法只需要一种试剂,影响因素较少,操作简单,其制片效果与改良后的次氯酸钠

离析法效果类似(图 2-d),可以用于脉序的定性和定量观测。

本试验通过单因素和正交试验对过氧乙酸法观测蓝靛果忍冬叶片脉序的制片条件进行了较深入的研究,得到了适于脉序观测的最佳处理条件。这一处理条件对与蓝靛果忍冬叶片差别不大的其它双子叶木本植物叶片脉序观测有一定的借鉴作用,而对于与蓝靛果忍冬叶片差别较大的单子叶草本植物叶片脉序的观测,则需要对离析条件重新进行摸索和调整。本研究得出过氧乙酸离析法观测蓝靛果忍冬叶片脉序的最佳处理条件为:用 12% 过氧乙酸溶液在 70℃ 水浴中处理叶片 3.5 h,或用 14% 的过氧乙酸溶液在 60℃ 水浴中处理叶片 3.5 h。

参考文献:

- [1] 李乐,曾辉,郭大立. 叶脉网络功能性状及其生态学意义[J]. 植物生态学报,2013,37(7): 691-698.
- [2] 刘剑秋,李和阳. 福建防己科植物叶脉序比较研究[J]. 福建师范大学学报:自然科学版,2000,16(2):80-84.
- [3] 任毅,胡正海. 独叶草叶二叉分枝脉序中网结脉和盲脉的形态学研究[J]. 植物分类学报,1996,34(6):569-576.
- [4] 温洁. 一种快速叶表皮离析法[J]. 植物学通报,1995,12(A01):77-72.
- [5] 孙同兴,江幸山. 简便有效的叶表皮离析方法-过氧化氢-醋酸法[J]. 广西植物,2009,29(1):44-47.
- [6] 周桂玲,魏岩,安争夕. 独行菜属植物叶片脉序的比较观察[J]. 云南植物研究,1997,19(3):280-284.
- [7] 谭大海,李富恒,裴雪,等. 次氯酸钠离析法观测甘蓝叶片脉序的处理条件优化筛选[J]. 植物学报,2010,45(5):588-593.
- [8] 曹丽敏,王志新,曹明,等. 中国无患子科植物的叶脉形态及其系统学意义[J]. 植物分类与资源学报,2014,36(4):419-432.
- [9] 曹小燕,曹明淞,邓敏. 中国水青冈属(壳斗科)叶结构及分类学意义[J]. 植物分类与资源学报,2014,36(1):1-6.
- [10] 洪亚平,陈之端. 易卷曲叶表皮制片技术(NaOCl 法)的改进[J]. 植物学通报,2002,19(6):746-748.
- [11] Van Setten A K, Koek-Noorman J. Studies in Annonaceae. VI. A leaf anatomical survey of genera of Annonaceae in the Neotropics[J]. Bot Jahrb Syst,1986,108(1):17-50.
- [12] 马清温,李凤兰,李承森. 落羽杉属(杉科)叶表皮结构及气孔参数[J]. 植物分类学报,2005,43(6):517-525.

(下转第 105 页)