

简便有效的叶表皮离析方法——过氧化氢—醋酸法

孙同兴¹, 江幸山²

(1. 盐城师范学院 生命科学与技术学院, 江苏 盐城 224002; 2. 华南农业大学 生命科学院, 广州 510642)

摘要: 在长期叶表皮制片过程中发现, 过氧化氢—醋酸离析法简便实用, 对蕨类植物小型叶和大型叶、裸子植物鳞形叶、钻形叶、针形叶、条形或带形叶及被子植物宽大的叶片均能适用。尤其重要的是, 过氧化氢—醋酸离析法不会破坏叶表皮细胞的结构, 有利于精确观察叶表皮形态特征, 是一种比较理想的叶表皮离析方法。

关键词: 叶表皮; 离析方法; 过氧化氢—醋酸

中图分类号: Q944.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2009)01-0044-04

$H_2O_2\text{-CH}_2\text{COOH}$ maceration ——a simple and perfect method for leaf epidermis

SUN Tong-Xing¹, JIANG Xing-Shan²

(1. School of Life Science and Technology, Yancheng Teachers College, Yancheng 224002, China;

2. College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The characteristics of $H_2O_2\text{-CH}_2\text{COOH}$ maceration for the preparation of leaf epidermis was reviewed. The maceration in equal volumes of acetic acid and 30% hydrogen peroxide didn't destroy the structures of epidermal cells and was suitable for the leaf epidermis of pteridophyte, gymnosperms and angiosperms.

Key words: leaf epidermis; maceration; hydrogen peroxide and acetic acid

叶片结构在植物系统分类中的作用已受到越来越多的重视(常朝阳等, 1997; 吴钿等, 2000; 李强等, 2007)。而植物叶表皮制片在光学显微镜下可以形象、直观而又清晰地显示植物叶表皮的细微结构, 包括表皮细胞的大小、排列方式、气孔器的类型、表皮毛的结构以及表皮表面角质层纹饰等。这些性状表现了稳定的种或属的结构特性, 已被证明具有重要的系统分类学意义(Olowokudejo, 1990)。另外, 植物表皮制片操作简单, 观察方便, 因此, 表皮构造在植物的分类鉴定和系统演化研究中已经为许多学者所重视和利用(Olowokudejo, 1990; 马清温等, 2005)。植物表皮制片一般采用叶片离析法, 主要原理是用化学试剂把表皮细胞与叶肉细胞间的中层物质溶解掉, 使表皮与叶肉分离。得到的表皮可以用作临时观察, 也可制成永久制片。取得植物叶表皮的离析方法有许多种, 如次氯酸钠法、过氧化氢—醋

酸法、铬酸—硝酸法、碳酸钠法、水煮法、氢氧化钠法、段续川法等。目前, 制得植物叶表皮普遍采用次氯酸钠法(温洁, 1995; 洪亚平等, 2002)和铬酸—硝酸法。过氧化氢—醋酸离析法又称 Franklin 法, 经常用来离析木材材料, 在叶片离析研究中仅见少数学者利用(Setten & Koek-Noorman, 1986; 马清温等, 2003, 2005)。而我们通过长期的植物叶表皮实验研究认为, 过氧化氢—醋酸离析法制得叶表皮既方便又理想, 对研究的多种植物类型都取得了比较满意的效果。现把这种离析方法的优点总结如下。

1 材料和方法

1.1 材料

商朝殷墟古墓出土未鉴定的植物叶片, 新鲜材料蕨类石松(*Lycopodium japonicum*)、番荔枝科囊

收稿日期: 2007-02-05 修回日期: 2008-06-27

基金项目: 江苏省高校自然科学基础研究项目(06KJD180201)[Supported by Foundation for Basic Research of Natural Science of Higher Education, Jiangsu Province(06KJD180201)]

作者简介: 孙同兴(1962-), 男, 山东青岛市人, 博士, 副教授, 从事结构植物学和演化植物学研究。

瓣木 (*Saccopetalum prolificum*) 和版纳野独活 (*Miliusa bannaensis*), 腊叶标本罗汉松科肉托竹柏 (*Nageia wallichiana*, 38991, E))、南洋杉科贝壳杉属 (*Agathis robusta*) (孙洪范 2022, PE) 和 *A. alba* (孙洪范 67, PE)、苏铁类托叶铁科 (*Bowenia spectabilis*) (孙洪范 19, PE)、番荔枝科藤春 (*Alphonsea monogyna*) (邢福武 5276, IBSC)。

1.2 方法

商朝殷墟古墓出土植物叶片直接放入等量 10% 过氧化氢—醋酸溶液中, 石松小型叶切成 2 mm 小段, 阔叶材料在中部切成 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 的小块, 浸泡在等量的 30% 过氧化氢—醋酸溶液中, 在 60 °C 烘箱内放置 12~24 h, 待叶肉组织和表皮细胞分离后, 把离析材料取出, 用毛笔轻轻扫除叶肉细胞, 漂洗干净, 1% 番红染色 5~10 min, 制作临时装片或采用洪亚平等(2002)方法制成永久制片, 在 LEICA DMLB 显微镜下观察和照相。

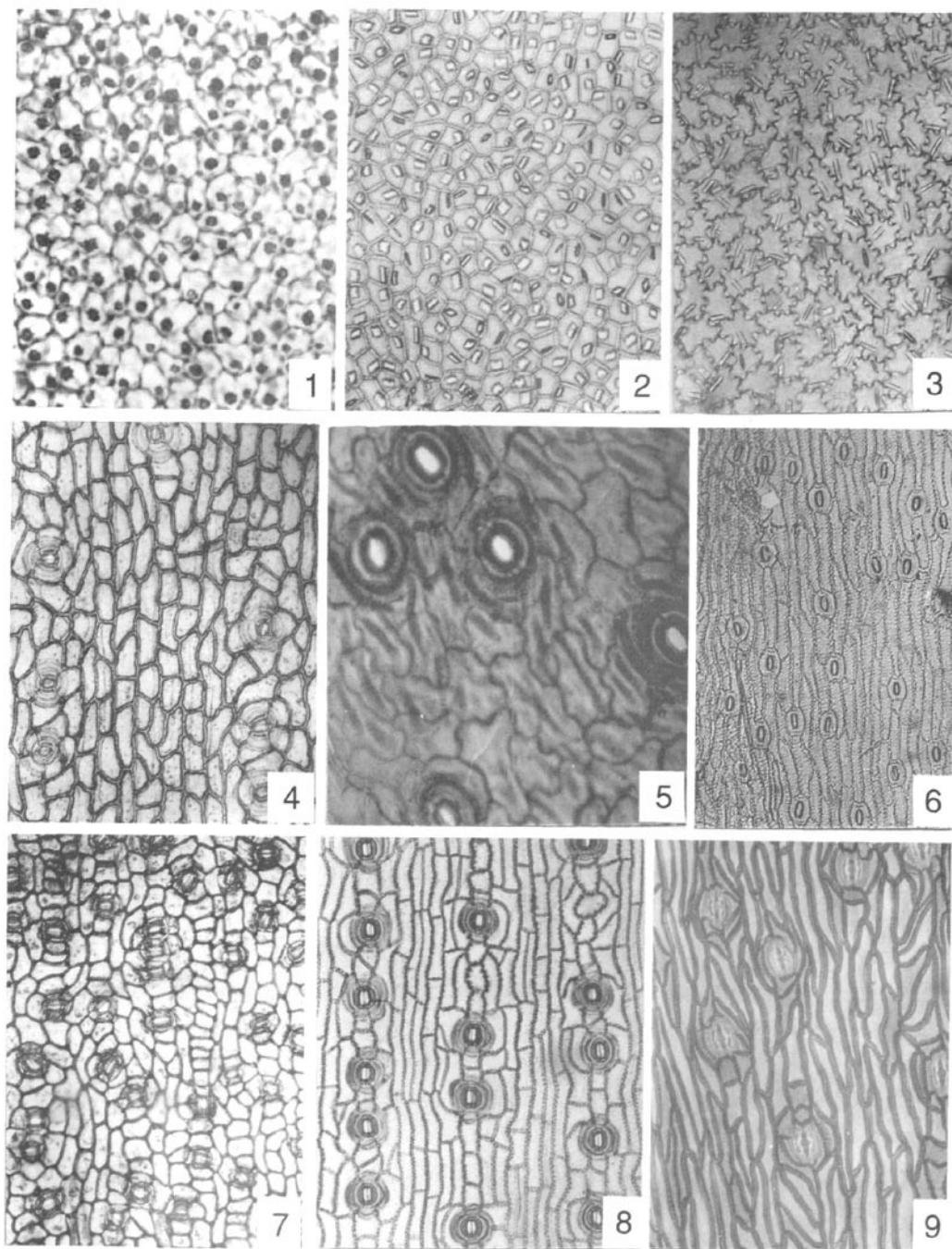
2 结果和讨论

上述植物叶表皮制片结果见图版 I : 1-9。

从实验结果看出, 过氧化氢—醋酸离析法的应用与植物叶片大小、生活习性(木本或草本)、质地(革质和纸质)关系不大, 各种材料经离析后都能得到清晰完整的叶表皮制片。另外, 利用此法对于新鲜材料和腊叶标本效果相同, 腊叶标本不需要提前水煮, 直接把材料放在离析液中。过氧化氢—醋酸离析法对浓度和离析时间要求不严, 普遍采用等量 30% 过氧化氢—醋酸溶液, 放在 60 °C 烘箱内 12~24 h, 时间稍长也不受影响, 一般离析完全后表皮会自动脱离。而对一些特殊材料只需根据叶片性质对过氧化氢浓度或离析时间略作改变, 如我们对取自商朝古都殷墟古墓穴内的植物叶片干标本, 采用等量 10% 过氧化氢和醋酸离析 12 h 就能够得到理想的叶表皮制片(图版 I : 5)。结合前人曾利用此法对蕨类植物阴地蕨科 (Botrychiaceae) 3 个属(焦瑜等, 2000)、裸子植物杉科红杉属 (*Sequoia*)、水杉属 (*Metasequoia*)、落羽杉属 (*Taxodium*)、水松属 (*Glyptostrobus*) 和台湾杉属 (*Taiwania*) (Ma & Li, 2002; Ma 等, 2004; 马清温等, 2003, 2005)、银杏 (*Ginkgo biloba*) (李正理等, 1989)、被子植物杨属山杨 (*Populus davidiana*) (Sun 等, 2004)、番荔枝科 (*Setten & Koek-Noorman*, 1986)、百合科七筋姑属

(*Clintonia*) (常朝阳等, 1997) 以及我们曾对蕨类植物石松属 (*Lycopodium*) 5 种 (Sun 等, 2005)、胡桃科青钱柳 (*Cyclocarya paliurus*) (孙同兴等, 2006) 等植物叶片采用过氧化氢—醋酸离析方法取得的效果认为, 过氧化氢—醋酸离析法对蕨类植物小型叶和大型叶、裸子植物鳞形叶、钻形叶、针形叶、条形或带形叶及被子植物宽大的叶片均能适用。

另外, 在实验过程中发现, 过氧化氢—醋酸法离析作用比较温和, 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。过氧化氢离析机理可能是在醋酸环境下氧化能力较为温和, 仅破坏细胞壁之间的中层结构, 使叶肉细胞和表皮细胞分离, 能够得到带有完整表皮细胞的表皮制片, 真实地显示出植物叶的表皮特征。如图版 I : 1, 2, 3 反映了番荔枝科植物叶片表皮细胞内普遍含有各种晶体, Setten & Koek-Noorman (1986) 利用过氧化氢—醋酸离析法对番荔枝科 177 种植物的叶表皮结构研究结果同 Patel (1971) 采用直接撕片法得到的结果一致, 都能清楚地观察到表皮细胞具有晶体分布。我们以前曾采用等量 30% 过氧化氢—醋酸离析法研究了番荔枝科蚁花属和澄广花属植物的叶片, 也清楚地发现两个属植物叶片表皮细胞内具有晶体存在 (孙同兴等, 2002)。而采用其它方法如铬酸—硝酸离析法等能破坏表皮细胞的基本结构, 使表皮结构的许多信息无法观察到, 铬酸和硝酸等强酸不仅能够把细胞间的中层物质分解掉而且还会把表皮细胞一同分解掉, 仅留下难以分解的角质层结构。如 Olowokudejo (1990) 利用 10% 铬酸与硝酸离析液研究番荔枝科番荔枝属 (*Annona*) 叶时没有发现任何表皮细胞具有晶体, 陈健辉等 (1995) 利用 10% 铬酸与硝酸离析液研究番荔枝科囊瓣木族野独活属、囊瓣木属、蚁花属 (*Mezettiospis*) 和澄广花属 (*Orophea*) 植物叶表皮时也没有得到含有任何晶体的表皮制片。利用铬酸与硝酸离析法制得的叶表皮制片在光学显微镜下观察, 看到的仅仅是印在角质层内壁上的表皮结构, 并不能反映植物叶表皮的真实特征。铬酸—硝酸离析法是目前利用扫描电镜观察角质层内表面结构的常用制备方法 (Stockey 等, 1978, 1992), 原理就是把表皮细胞分解掉, 得到印有表皮细胞结构、气孔器结构以及其它表皮附属物印痕的角质层, 然后在扫描电镜下观察角质层内表面, 这些角质层内壁的结构能以负像的形式反映出表皮的特征。所以要利用光学显微镜精确观察叶



图版 I 1. 番荔枝科藤春叶近轴面, 示细胞内晶体($\times 100$) ; 2. 番荔枝科版纳野独活叶近轴面, 示细胞内晶体($\times 100$) ; 3. 番荔枝科囊瓣木叶近轴面, 示细胞内晶体($\times 100$) ; 4. 南洋杉科叶远轴面($\times 100$) ; 5. 商朝殷墟古墓出土的未知植物叶远轴面($\times 240$) ; 6. 石松科石松叶表皮($\times 65$) ; 7. 南洋杉科叶远轴面($\times 100$) ; 8. 罗汉松科肉托竹柏叶远轴面($\times 125$) ; 9. 托叶铁科叶远轴面($\times 100$)。

Plate I 1. Adaxial epidermis of *Alphonsea monogyna* (Annonaceae), showing crystals in epidermal cells ($\times 100$) ; 2. Adaxial epidermis of *Miliusa barnaeensis* (Annonaceae), showing crystals in epidermal cells ($\times 100$) ; 3. Adaxial epidermis of *Succopetalum prolificum* (Annonaceae), showing crystals in epidermal cells ($\times 100$) ; 4. Abaxial epidermis of *Agathis robusta* (Araucariaceae) ($\times 100$) ; 5. Abaxial epidermis of a species of unidentified leaf unearthed from an ancient tomb in Yinxu, the Capital of the Shang Dynasty ($\times 240$) ; 6. Leaf epidermis of *Lycopodium japonicum* (Lycopodiaceae) ($\times 65$) ; 7. Abaxial epidermis of *Agathis alba* (Araucariaceae) ($\times 100$) ; 8. Abaxial epidermis of *Nageia wullichiana* (Podocarpaceae) ($\times 125$) ; 9. Abaxial epidermis of *Bowenia spectabilis* (Stangeriaceae) ($\times 100$) .

表皮特征尤其是表皮细胞内的结构,采用过氧化氢—醋酸离析液比较适宜。

参考文献:

- Chang ZY(常朝阳), Li SF(李思锋). 1997. The leaf epidermal features and their systematic significance of the genus *Clintonia* Raf.(七筋姑属叶表皮形态特征及其系统学意义)[J]. *Acta Bot Boreal-Orient Sin*(西北植物学报), 17(4): 468—473
- Chen JH(陈健辉), Li PT(李秉滔). 1995. A comparative anatomical observation of leaf epidermic morphology of the Saccopetalae(Annonaceae) in China(中国番荔枝科囊瓣木族植物叶表皮形态的观察与比较)[J]. *J Guangzhou Teachers Coll*(广州师院学报), 2, 38—47
- Hong YP(洪亚平), Chen ZD(陈之端). 2002. Improvement on NaOCl method used for the liable-to-roll-up leaf epidermis(易卷曲叶表皮制片技术(NaOCl法)的改进)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), 19(6): 746—748
- Jiao Y(焦瑜), Wang SJ(王士俊). 2000. The leaf epidermal structures of three species of *Botrychiaceae* from China(三种国产阴地蕨科植物叶的表皮构造)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), 17(4): 352—359
- Li ZL(李正理), He X(贺晓), Xu BW(徐炳文). 1989. The epidermal structure of *Ginkgo* leaf(银杏叶表皮结构)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 31(6): 427—431
- Li Q(李强), Deng Y(邓艳), Yu LJ(余龙江), et al. 2007. Research on structure of leaf epidermis of two species of *Flos Lonicerae* by SEM and its ecological adaptation(两种忍冬属植物叶表皮扫描电镜观察及其生态性适应的研究)[J]. *Guizhaia*(广西植物), 27(2): 8—13
- Ma QW, Li CS. 2002. Epidermal structures of *Sequoia sempervirens* (Taxodiaceae)[J]. *Taiwania*, 47(3): 194—202
- Ma QW(马清温), Zhang JB(张金保). 2003. Epidermal structures of *Metasequoia glyptostroboides* (Taxodiaceae)(水杉(杉科)的叶表皮结构)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), 23(1): 32—35
- Ma QW, Li CS, Li FL, et al. 2004. Epidermal structures and stomatal parameters of Chinese endemic *Glyptostrobus pensilis* (Taxodiaceae)[J]. *Bot J Lin Soc*, 146: 153—162
- Ma QW(马清温), Li FL(李凤兰), Li CS(李承森). 2005. Leaf epidermal structure and stomatal parameters of the genus *Taxodium* (Taxodiaceae)(落羽杉属(杉科)叶表皮结构及气孔参数)[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报), 43(6): 517—525
- Olowokudejo JD. 1990. Comparative morphology of leaf epidermis in the genus *Annona* (Annonaceae) in West Africa[J]. *Phyto-morphology*, 40(3&4): 407—422
- Patel RJ. 1971. Epidermal structure and development of stomata in some Annonaceae [J]. *Ann Bot*, 35: 1 205—1 212
- Setten AK van, Koek-Noorman J. 1986. Studies in Annonaceae. VI. A leaf anatomical survey of genera of Annonaceae in the Neotropics[J]. *Bot Jahrb Syst*, 108(1): 17—50
- Stockey RA, Taylor NT. 1978. Cuticular feathers and epidermal patterns in the genus *Araucaria* de Jussieu[J]. *Bot Gaz*, 139(4): 490—498
- Stockey RA, Ko H, Woltz P. 1992. Cuticle micromorphology of *Falcatifolium* de Laubenfels(Podocarpaceae)[J]. *Int J Plant Sci*, 153(4): 589—601
- Sun BN, Yan DF, Xie SP, et al. 2004. Palaeogene fossil *Populus* leaves from Lanzhou Basin and their palaeoclimate significance [J]. *Chin Sci Bull*, 49(13): 1 283—1 289
- Sun TX(孙同兴), Wu H(吴鸿), Chen XF(陈新芳), et al. 2002. Comparative sanatomy on leaves of *Mezziopsis* and *Orophea* (Annonaceae)(番荔枝科蚊花属和澄广花属叶的比较解剖学研究)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 24(6): 743—753
- Sun TX(孙同兴), Xu LL(徐丽丽). 2006. Identification of leaf structure of *Cyclocarya paliurus*(青钱柳叶的结构鉴定)[J]. *Chin Trad Herb Drugs*(中草药), 37(2): 271—273
- Sun TX, Edwards D, Li CS. 2005. Stomatal apparatus of *Lycopodium japonicum* and its bearing on the stomata of Devonian ly-cophyte *Drepanophycus spiniformis*[J]. *Bot J Lin Soc*, 149: 209—216
- Wen J(温洁). 1995. A rapid method of isolating and clearing organs on foliar epidermis(一种快速叶表皮离析法)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), 12(Suppl.): 77
- Wu D(吴钿), Ye CH(叶昌辉), Zhang XZ(张秀枝). 2000. Study on the anatomical structures of the leaf *Nepenthes mirabilis*(猪笼草叶的形态解剖结构研究)[J]. *Guizhaia*(广西植物), 20(2): 57—59

简便有效的叶表皮离析方法——过氧化氢-醋酸法

作者: 孙同兴, 江幸山, SUN Tong-Xing, JIANG Xing-Shan
作者单位: 孙同兴, SUN Tong-Xing(盐城师范学院, 生命科学与技术学院, 江苏, 盐城, 224002), 江幸山, JIANG Xing-Shan(华南农业大学, 生命科学学院, 广州, 510642)
刊名: 广西植物 [ISTC PKU]
英文刊名: GUIHAI
年, 卷(期): 2009, 29(1)
被引用次数: 11次

参考文献(21条)

- 常朝阳, 李思锋 七筋姑属叶表皮形态特征及其系统学意义[期刊论文]-西北植物学报 1997(4)
- 陈健辉;李秉滔 中国番荔枝科囊瓣木族植物叶表皮形态的观察与比较 1995(02)
- 洪亚平, 陈之端 易卷曲叶表皮制片技术(NaOCl法)的改进[期刊论文]-植物学通报 2002(6)
- 焦瑜, 王士俊 三种国产阴地蕨科植物叶的表皮构造[期刊论文]-植物学通报 2000(4)
- 李正理;贺晓;徐炳文 银杏叶表皮结构 1989(06)
- 李强, 邓艳, 余龙江, 刘玉, 曹建华 两种忍冬属植物叶表皮扫描电镜观察及其生态适应性的研究[期刊论文]-广西植物 2007(2)
- Ma QW;Li CS Epidermal structures of *Sequoia sempervirens*(Taxodiaceae) 2002(03)
- 马清温, 张金保 水杉(杉科)的叶表皮结构[期刊论文]-植物研究 2003(1)
- Ma QW;Li CS;Li FL Epidermal structures and stomatal parameters of Chinese endemic *Glyptostrobus pensilis*(Taxodiaceae) 2004
- 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[期刊论文]-植物分类学报 2005(6)
- Olowokudejo JD Comparative morphology of leaf epidermis in the genus *Annona*(Annonaceae) in West Africa 1990(3-4)
- Patel RJ Epidermal structure and development of stomata in some Annonaceae 1971
- Setten AK van;Koek-Noorman J Studies in Annonaceae. VI. A leaf anatomical survey of genera of Annonaceae in the Neotropics 1986(01)
- Stockey RA;Taylor NT Cuticular feathers and epidermal patterns in the genus Araucaria de Jussieu 1978(04)
- Stockey RA;Ko H;Woltz P Cuticle micromorphology of *Falcatifolium de Laubenfels*(Podocarpaceae) 1992(04)
- Sun BN;Yan DF;Xie SP Palaeogene fossil *Populus* leaves from Lanzhou Basin and their palaeoclimate significance 2004(13)
- 孙同兴, 吴鸿, 陈新芳, 侯学良, 李秉滔 番荔枝科蚊花属和澄广花属叶的比较解剖学研究[期刊论文]-云南植物研究 2002(6)
- 孙同兴, 徐丽丽 青钱柳叶的结构鉴定[期刊论文]-中草药 2006(2)
- Sun TX;Edwards D;Li CS Stomatal apparatus of *Lycopodium japonicum* and its bearing on the stomata of Devonian lycophyte *Drepanophycus spinaeformis* 2005
- 温洁 一种快速叶表皮离析法 1995(Suppl)
- 吴钿, 叶昌辉, 张秀枝 猪笼草叶的形态解剖结构研究[期刊论文]-广西植物 2000(2)

本文读者也读过(10条)

1. 张亚冰, 王秀云, 洪亚平 植物叶表皮制片方法改进[期刊论文]-安徽农业科学2008, 36 (29)
2. 戴锡玲, 庞婉婷, 王全喜, 陆薇 蕨类植物腊叶标本叶表皮制片技术的改进[期刊论文]-生物学通报2009, 44 (2)
3. 梁维, 杨晓红, 陈吉裕, 周志钦, LIANG Wei, YANG Xiao-Hong, CHEN Ji-Yu, ZHOU Zhi-Qin 几种用于光学显微镜观测的桑叶表皮整体制片方法比较[期刊论文]-蚕业科学2009, 35 (1)
4. 周玲玲, 刘萍, 王军, ZHOU Ling-ling, LIU Ping, WANG Jun 新疆2种盐生补血草营养器官的解剖学研究[期刊论文]-西北植物学报2007, 27 (6)
5. 唐锐, 王丽, 李高阳, 曹袁祺, TANG Rui, WANG Li, LI Gao-Yang, CAO Yuan-Qi 大叶藓7个自然居群的形态解剖学研究[期刊论文]-四川大学学报(自然科学版)2009, 46 (3)
6. 陆嘉惠, 李学禹, 周玲玲, 吴玲, LU Jia-Hui, LI Xue-Yu, ZHOU Ling-Ling, WU Ling 甘草属植物叶表皮特征及其系统学意义[期刊论文]-云南植物研究2005, 27 (5)
7. 李耀龙, LI Yaolong 连翘花粉、柱头、花柱和叶表皮的扫描电镜观察[期刊论文]-宁夏师范学院学报2010, 31 (3)
8. 严寒静, 梁路娇, 房志坚, YAN Han-Jing, LIANG Lu-Jiao, FANG Zhi-Jian 不同产地何首乌叶表皮结构的解剖学特征与气候因子的关系[期刊论文]-广西植物2009, 29 (1)
9. 逢云莉, 唐自慧, 王奇志, 任海燕, 何兴金, PANG Yun-Li, TANG Zi-Hui, WANG Qi-Zhi, REN Hai-Yan, HE Xing-Jin 中国柴胡属植物叶表皮特征及系统学意义[期刊论文]-武汉植物学研究2009, 27 (2)
10. 王世强, 方建新, 王德青, WANG Shi-qiang, FANG Jian-xin, WANG De-qing 一种简便快速鲜叶表皮制片技术[期刊论文]-生物学杂志2006, 23 (4)

引证文献(7条)

1. 常盼盼, 钟小仙, 吴娟子, 沈益新, 刘智微 海滨雀稗新材料叶表皮微形态结构特异性分析[期刊论文]-江苏农业学报 2011 (06)
2. 刘智微, 钟小仙, 吴娟子, 张建丽, 潘玉梅 海盐胁迫对苏牧2号象草叶片解剖结构的影响[期刊论文]-中国草地学报 2012 (06)
3. 潘昕, 邱权, 李吉跃, 王军辉, 何茜, 苏艳, 马建伟, 杜坤 基于叶片解剖结构对青藏高原25种灌木的抗旱性评价[期刊论文]-华南农业大学学报 2015 (2)
4. 常盼盼, 钟小仙, 刘智微 海滨雀稗体细胞突变体SP2008-3的特异性分析[期刊论文]-草业学报 2012 (06)
5. 王富廷, 杨炜茹, 郝瑞杰, 王涛, 张启翔 梅花垂枝性状次生木质部解离研究[期刊论文]-广西植物 2014 (03)
6. 秋水仙碱诱导的苏丹草与拟高粱杂交种新材料倍性鉴定[期刊论文]-江苏农业学报 2012 (06)
7. 李华鑫 豫南引进茶树品种生育特性比较及综合评价体系建立[学位论文]硕士 2010

引用本文格式: 孙同兴, 江幸山, SUN Tong-Xing, JIANG Xing-Shan 简便有效的叶表皮离析方法——过氧化氢-醋酸法[期刊论文]-广西植物 2009 (1)