

小金海棠果实表皮制片方法的比较研究

章黎黎, 李兴武

(重庆旅游职业学院, 重庆黔江 409000)

摘要: 为了简便而快速制作适用于光学显微镜观测的苹果属植物果实表皮标本, 采用 7 种方法分别对小金海棠果实表皮进行整体制片后于光学显微镜下观察其形态特征, 比较制片效果。结果表明: 用离析刮片法、指甲油印迹法、刮片法和煮沸剥离刮片法制备的标本在光学显微镜下均呈现出清晰结构, 其中煮沸剥离刮片法的制片效果最佳。因此, 煮沸剥离刮片法最适用于苹果属植物果实表皮整体制片, 该方法操作简便且效率高。

关键词: 小金海棠; 果实表皮; 光学显微镜; 制片方法

中图分类号: Q94-336

文献标志码: A

Comparative Study of Specimen Preparation Methods of *Malus xiaojinensis* Fruit Epidermis

ZHANG Lili, LI Xingwu

(Chongqing Vocational Institute of Tourism, Qianjiang, Chongqing 409000, China)

Abstract: In order to develop a simple and fast as well as adequate epidermal preparation technique, seven different preparation methods were adopted to prepare fruit epidermal specimens of *Malus xiaojinensis* for light microscopic observation of its morphological features. A comparison between these methods indicated that four of them, namely acid eduction method, nail polish blotting method, scraping method, and boiling peeling scraping method, could yield clear epidermal structure under microscope. And the effect of production with boiling peeling scraping method was significantly better than that of other methods. Thus the boiling peeling scraping method is considered as the most applicable one to prepare specimens for *Malus* fruit epidermis. Besides, it has such advantages as easy sampling, simple procedure and high efficiency.

Key words: *Malus xiaojinensis*; fruit epidermis; light microscope; specimen preparation

研究发现, 果实表皮微形态特征的观察与分析在解决飘拂草属(*Fimbristylis*)等植物不同等级分类群的系统发育关系上发挥了重要作用^[1-5], 认为果皮和种子受环境饰变影响较小, 它们的表面纹饰特征多样性可以为植物系统发育与进化提供有价值的信息和较为可靠的证据^[6-8]。苹果属(*Malus*)植物果实表皮微形态特征可作为苹果属植物分类学研究中探讨该属的分类和系统演化关系的重要解剖学依据之一^[9]。通常在光学显微镜下即可形象、直观而

又清晰地观察到果实表皮微形态结构, 如表皮细胞的形状、细胞大小、纹孔数量、细胞排列模式以及有无果锈、气孔器等^[10-12]。然而, 苹果属植物因其果实表皮细胞与果肉细胞结合紧密, 对其果实表皮整体制片非常困难。因此有必要探索一种适用于光学显微镜下观察, 且操作简便快速、真实性强的苹果属植物果实表皮制片技术。本试验分别采用 7 种不同的方法进行苹果属植物果实表皮整体制片, 然后在光学显微镜下观察、比较各种方法的制片效果, 为将苹

收稿日期: 2013-08-15; 修改稿收到日期: 2013-10-16

基金项目: 重庆市教改项目(133236); 重庆市大学生创新创业训练计划项目(201314316009)

作者简介: 章黎黎(1984—), 女, 硕士, 讲师, 主要从事植物学方面研究。E-mail: watermelon369@163.com

果属植物果实表皮微形态特征作为苹果属系统发育研究的依据之一提供基础试验方法。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为苹果属小金海棠(*Malus xiaojinensis*)当年的成熟果实,采自西南大学种质资源圃。将果实整体从上到下分成3等分,取中间部分任意一个位置的果实表皮均可(图版 I, 1)。

1.2 方法

1.2.1 直接剥离法 用镊子直接撕下或剥离材料表皮,将剥离的材料表皮经番红染色冲洗后平展在滴有水滴的载玻片上,盖上盖玻片置于光学显微镜下观察。

1.2.2 煮沸剥离法 将材料放入沸水中煮至果实表皮松软泛白,用镊子取出材料,撕取材料表皮经番红染色冲洗后平展在滴有水滴的载玻片上,盖上盖玻片置于光学显微镜下观察。

1.2.3 离析刮片法 将材料放入有 Jeffery 离析液 [$V_{\text{铬酸}}:V_{\text{硝酸}}=1:1$] 的青霉素小瓶中,于 100℃ 温箱离析^[13-14],直至果实表皮松软泛白,果肉与表皮开始分离,蒸馏水漂洗 2~3 次,然后将材料移入放有蒸馏水的培养皿中撕取材料表皮,刮去多余的果肉杂质,将获得的材料表皮经番红染色冲洗后平展在滴有水滴的载玻片上,盖上盖玻片置于光学显微镜下观察^[15]。

1.2.4 指甲油印迹法 将指甲油均匀涂在材料表皮上,自然晾干 5~15 min(受光照、风等影响,晾干所需时间略有不同),轻轻挤压指甲油涂层,使其与材料表皮充分接触,待指甲油涂抹层形成膜并在—侧与材料表皮有分离时,用镊子夹住分离膜处顺势撕下已干的指甲油膜层,然后经番红染色冲洗后,将指甲油膜的下面(与材料表皮接触的面)平展在滴有水滴的载玻片上,盖上盖玻片置于光学显微镜下观察。

1.2.5 透明胶带粘取法 将塑料透明胶带拉开 4~5 cm,胶面朝上,平放在实验台上。先将剥离的材料表皮粘在胶带上,再把胶带对折过来平整地粘贴在粘有果肉的一面,用手指对捏胶带,使胶带与表皮、粘有果肉的表面充分接触,再将对折的胶带撕开,将粘有表皮的胶带经番红染色冲洗后粘贴在载玻片上^[16],不用盖玻片直接在光学显微镜下观察。

1.2.6 刮片法 用镊子直接撕下或剥离材料表皮,刮去粘在表皮上的果肉,留下表皮,经番红染色冲洗

后,平展在滴有水滴的载玻片上,盖上盖玻片置于光学显微镜下观察。

1.2.7 煮沸剥离刮片法 将材料放入沸水中煮至果实表皮松软泛白,用镊子取出材料,撕取表皮,刮去粘在表皮上的果肉,将获得的材料表皮经番红染色冲洗后平展在滴有水滴的载玻片上,盖上盖玻片置于光学显微镜下观察。

1.3 观察、拍照

用 Motic 数码显微系统直接观察、拍照。

2 结果与分析

2.1 不同制片方法制备标本的小金海棠果实表皮一般微形态特征

图版 I 是分别用 7 种制片方法制备的小金海棠果实表皮标本在光学显微镜下呈现的微形态特征。小金海棠果实表皮仅有 1 层细胞,包括表皮细胞以及果锈、气孔器的分布。小金海棠果实表皮细胞为多边形,存在有规律的轮状排列模式(图版 I, 2, 3),细胞大小为 $(508.30 \pm 24.35) \mu\text{m}^2$,细胞间隙为 $(1.42 \pm 0.08) \mu\text{m}$ 、纹孔对数量为 (4.0 ± 0.23) ,以及纹孔宽度为 $(1.45 \pm 0.06) \mu\text{m}$ ^[9]。果锈是果面浮生的 1 层黄褐色或赤褐色木栓组织,它的发生是由于表皮和下皮细胞受到不良因子的刺激,栓化或产生木栓组织,顶破角质层,使果面周皮化^[17]。果锈有的完整,有的存在缺损,多为圆形或椭圆形(图版 I, 4, 5)。气孔器偶见,主要由保卫细胞和它们之间的气孔组成,没有副卫细胞,属于无规则型气孔器,气孔形状为椭圆形或近圆形(图版 I, 2)。

2.2 不同制片方法的制片效率比较

从表 1 可见,采用直接剥离法撕取材料表皮难度很大,制取 1 片面积约 4 mm^2 的样本装片需要 14~17 min,并且制片效果非常差,获取的表皮面积占取样面积的 0%;采用煮沸剥离法制取 1 片面积约 5 mm^2 的样本装片需要 75~80 min,获取的表皮面积占取样面积的 10%;用透明胶带粘取法粘取材料表皮的难度同样很大,制取 1 片面积约 5 mm^2 的样本装片需要 30~40 min,制片效果同直接剥离法;刮片法与前 3 种方法相比较,不仅制片时间短,而且制片效果较好,获取的表皮面积占取样面积的 50%;采用离析刮片法制取样本装片需要的时间较长,但待离析好之后,一般只需 3~5 min 即可制备多份材料表皮标本,并且获取的表皮面积占取样面积的 90%~95%,只是制片时稍微用力就会把表皮刮破,大大增加了制片难度;采用指甲油印迹法的制

表 1 7 种制片方法的制片效率与标本质量分析

Table 1 Specimen preparation efficiency and quality analysis of seven methods

方法 Method	标本制作时间 Time used for making the specimen/min	标本最大面积 Maximum epidermis area sampled/mm ²	获取表皮面积占 取样面积百分比 Percentage of epidermal area to sampled area/%	取样定位性 Location of sampling	标本清晰度 Clearness of specimen	表皮细胞的真实性 Status of epidermal cell
直接剥离法 Directly peeling method	14~17	4	0	差 Bad	低 Low	差 Bad
煮沸剥离法 Boiling and peeling method	75~80	5	10	差 Bad	低 Low	差 Bad
离析刮片法 Acid eduction method	90~100	5	90~95	好 Best	高 Highest	好 Best
指甲油印迹法 Nail polish blotting method	20	5	85~90	较好 Better	较高 Higher	较好 Better
透明胶带粘取法 Transparent adhesive tape sticking method	30~40	5	0	差 Bad	低 Low	差 Bad
刮片法 Scraping method	25~30	4	40~50	较好 Better	较高 Higher	较好 Better
煮沸剥离刮片法 Boiling peeling and scraping method	80~90	6	97~100	好 Best	高 Highest	好 Best

片时间较短,可获取的表皮面积占取样面积的 85%~90%,但是指甲油的浓度和厚度影响制片的质量和观察效果,只能看到表皮细胞的大致轮廓,以至于看不清纹孔这种较精细的结构;而采用煮沸剥离刮片法获取材料表皮,待果实表皮煮松软泛白后,一般只需 2~4 min 即可制取多份材料表皮标本,可获取的表皮面积可达取样面积的 100%。综合表 1 的分析结果认为,采用煮沸剥离刮片法进行苹果属植物果实表皮制片的制片效率最高。

2.3 不同制片方法的取样定位性比较

目前最常用的观察植物表皮细胞微形态结构的方法有直接剥离法、煮沸剥离法、透明胶带粘取法和刮片法^[18],但是,这些方法对于苹果属植物而言,都有取样定位性较差的缺点,然而获取苹果属植物果实表皮面积的大小和取样定位性的优差在研究果实表皮微形态特征(如:细胞排列模式)时非常重要。获取表皮面积占取样面积的百分比越大,在镜检时对观察部位的选择余地就越大,更有利于果实表皮微形态特征的定位观察和研究。

从表 1 可以看出,直接剥离法和透明胶带粘取法制取果实表皮标本的取样能力和定位性差,且只能观察到果肉细胞,达不到定位取样的目的;煮沸剥离法,虽然获取的表皮面积占了取样面积的 10%,但是只能模糊地看到表皮细胞的轮廓,并且多层细胞重叠影响微形态特征的观察,同时也很难达到定位取样的目的;采用刮片法制片的难度比较大,稍微用力就会把表皮刮破,但是获取的表皮面积达到了取样面积的 40%~50%,所以取样定位性比前 3 者要好些;指甲油印迹法获取的表皮面积可达取样面积的 85%~90%,由于苹果属植物的果实近似圆球形,所以用此法取样时取样部位易受果实弧度的影

响,易导致镜检时观察的细胞不在一个平面上,影响观察效果,因此取样定位性只是较最常用的方法好些;而采用离析刮片法和煮沸剥离刮片法获取果实表皮,基本可以实现在材料任一部位取样,不仅定位性好,而且标本的清晰度高,制片效果优于其他 5 种制片方法。

2.4 不同制片方法制备的标本清晰度及表皮细胞微形态结构精准性比较

从图版 I 可以看出,离析刮片法、指甲油印迹法、刮片法和煮沸剥离刮片法制备的标本清晰度比较高,均可以看到表皮细胞(图版 I,6、2、7、3)。其中,刮片法制备的标本虽清晰度较高,但是存在细胞重叠的现象,观察测量时易受干扰,测得的数据精确度较差;指甲油印迹法和离析刮片法制备的标本可以清楚地看到气孔器、果锈的存在,但该法制备标本在撕取指甲油涂抹层时,由于指甲油印迹膜薄且柔软,撕取过程中容易撕拉变形,表皮细胞的微形态结构也随之变形,使气孔器的大小、细胞排列模式等易发生变化,制作的标本只能大致呈现出果实表皮微形态特征;离析刮片法和煮沸剥离刮片法制备的标本清晰度和果实表皮细胞微形态结构的真实性最高,取样定位性好,平整性也好,因此无论是观察表皮细胞形状、测量细胞大小,还是测量细胞间隙、纹孔宽度和纹孔数量的计数分析等,其效果都好。以上 4 种方法观察到的表皮细胞,其清晰程度和真实性只有细微的差异,而其余方法制备的标本清晰度较差。直接剥离法和透明胶带粘取法制作的装片真实性最差(图版 I,8、9),不能呈现出表皮细胞的结构,所以无法对表皮细胞微形态结构进行精准性分析;煮沸剥离法制作的装片,虽然能看到表皮细胞的基本轮廓和分布排列情况,但由于有很多层细胞重

叠在一起粘在表皮上,其清晰程度也很差,直接影响到观察、测量等(图版 I, 4)。

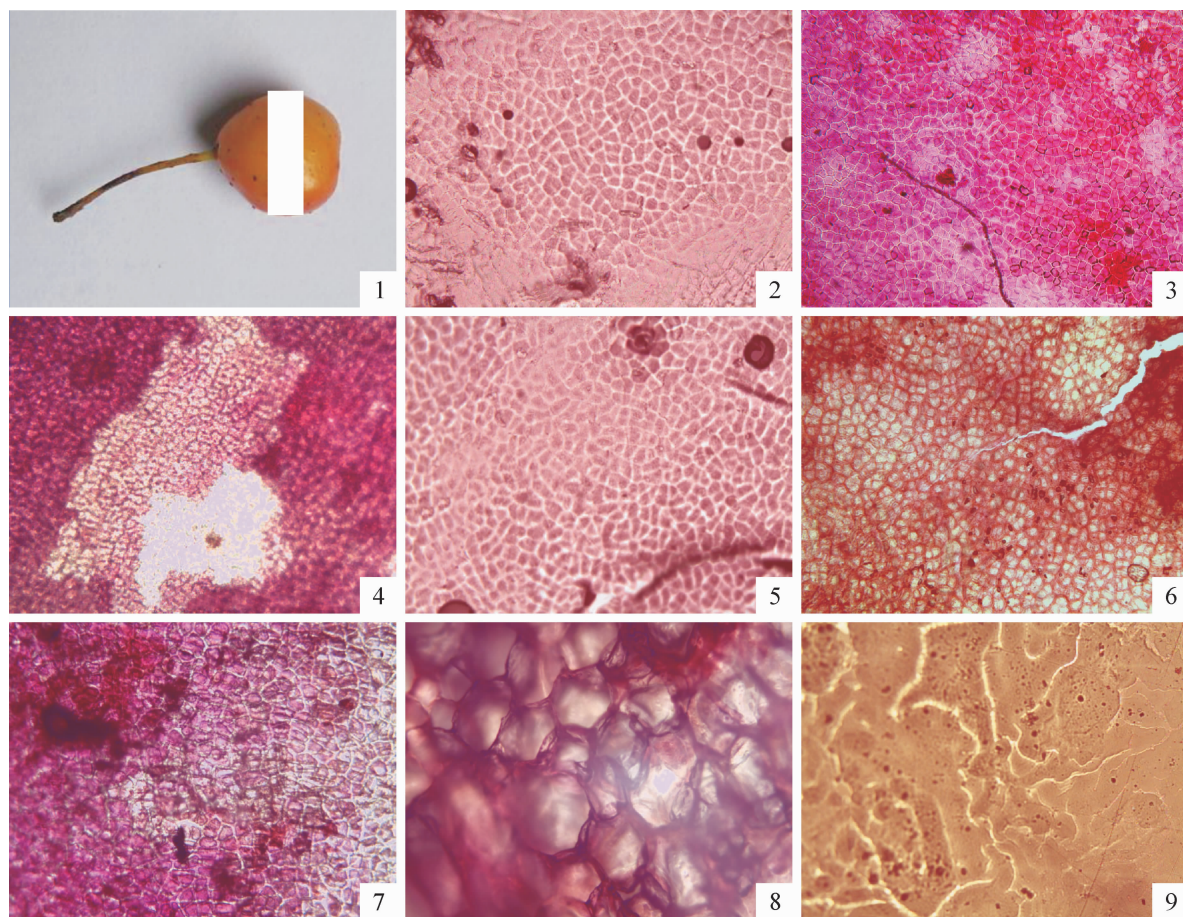
3 讨 论

在光学显微镜下观察不同方法制作的苹果属植物果实表皮标本,比较各种方法的制片效率和质量认为:刮片法、离析刮片法、指甲油印迹法和煮沸剥离刮片法可用于苹果属植物果实表皮制片观察表皮细胞的微形态结构。其中,离析刮片法、煮沸剥离刮

片法与刮片法、指甲油印迹法相比具有取样定位性好、标本清晰度高、表皮细胞真实性强等优点,但是煮沸剥离刮片法获取的表皮面积可达取样面积的100%,显著大于离析刮片法,且较不容易把表皮刮破,很适宜苹果属植物果实表皮微形态特征的观察、测量。因此认为,煮沸剥离刮片法是7种方法中最适用于简便而快速地制作苹果属植物果实表皮标本的方法。

参考文献:

- [1] LIU J Q(刘剑秋). Micromorphological characters of achene epidermis of Chinese *Fimbristylis* (Cyperaceae) and their systematic evaluation[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2001, **21**(2): 351—359(in Chinese).
- [2] JUAN R, PASTOR J, FEMANDEZ I. SEM and light microscope observations on fruit and seeds in scrophulariaceae from southwest spain and their systematic significance[J]. *Annals of Botany*, 2000, **86**(2): 323—338.
- [3] SU Y J(苏应娟), WANG T(王 艇), ZHANG H D(张宏达). A study on the aril micromorphological features of some gymnosperms and its taxonomic significance[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 1997, **17**(3): 392—398(in Chinese).
- [4] MA W L(马万里), GAO Y CH(高艳春). Study on ultrastructure of achene epidermis and its taxonomic implications to *Carex* (Cyperaceae)[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 1998, **18**(1): 66—71(in Chinese).
- [5] HUANG Y P(黄运平), YIN Z T(尹祖棠). The preliminary study on the micromorphological features of achene surfaces of *Saussurea*[J]. *Bulletin of Botanical Research* (植物研究), 1994, **14**(4): 395—400(in Chinese).
- [6] WANG Y G(王玉国), LI G ZH(李光照), ZHANG W J(张文驹), *et al.* A systematic study of the genus *Rhododendron* (Ericaceae) using micromorphological characters of fruit surface and seed coat[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), 2007, **45**(1): 21—38(in Chinese).
- [7] ZHOU C Y(周存宇), LIU Y(刘 阳), YANG CH D(杨朝东). Comparison of Amaryllidaceae leaf anatomical structure and microstructure[J]. *Hubei Agriculture Sciences* (湖北农业科学), 2012, **51**(8): 1 603—1 607(in Chinese).
- [8] GAO P(郜 鹏), LIAO CH Y(廖晨阳), HE X J(何兴金). Micromorphological features of pericarp surface of *Pleurospermum* (Apiaceae) in China and its taxonomic significance[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2011, **31**(9): 1 765—1 773(in Chinese).
- [9] ZHANG L L(章黎黎), YANG X H(杨晓红). Micromorphological features of fruit epidermis of *Malus* in China and their relationship with phylogenesis of the genus[J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2010, **37**(10): 1 549—1 558(in Chinese).
- [10] KONARSKA A. The structure of the fruit peel in two varieties of *Malus domestica* Borkh. (Rosaceae) before and after storage[J]. *Protoplasma*, 2013, **250**(3): 701—714.
- [11] LÜ Y L(吕玉龙), TANG L H(唐立红). Improvement of flaking method of leaf epidermis[J]. *Journal of Anhui Agri. Sci.* (安徽农业科学), 2011, **39**(3): 1 289, 1 297(in Chinese).
- [12] DENK T, VELITZELOS D. First evidence of epidermal structures of Ginkgo from the Mediterranean Tertiary[J]. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 2002, **120**: 1—15.
- [13] 郑国钊. 生物显微技术[M]. 北京: 人民教育出版社, 1978: 132—135.
- [14] 米浩然. 植物制片技术学[M]. 北京: 人民教育出版社, 1960: 173—176.
- [15] ZHANG ZH Y(张志耘), LU B R(卢宝荣), WEN J(温 洁). The structural features of leaf epidermis in *Oryza* and their systematic significance[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), 1998, **36**(1): 8—18(in Chinese).
- [16] ZHANG L H(张丽华), WANG F(王 芳), HAN H ZH(韩浩章), *et al.* The application of sellotape in biological microscope slides[J]. *Anhui Agri. Sci. Bull.* (安徽农学通报), 2012, **18**(19): 37—39(in Chinese).
- [17] WU H J(吴厚玖), CHEN R ZH(陈荣柱), LI Y N(李育农). Studies on the date of occurrence and histological development of russetting in golden delicious apples[J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 1984, **11**(1): 51—56(in Chinese).
- [18] LIANG W(梁 维), YANG X H(杨晓红), CHEN J Y(陈吉裕), *et al.* A comparison of several specimen preparation methods for light microscopic observation of Mulberry leaf epidermis[J]. *Science of Sericulture* (蚕业科学), 2009, **35**(1): 116—120(in Chinese).



图版 I 1. 苹果属材料定位取样示意图; 2~9. 7 种制片方法制备小金海棠果实表皮标本在光学显微镜下的形态特征: 2. 指甲油印迹法, $\times 100$; 3. 煮沸剥离刮片法, $\times 100$; 4. 煮沸剥离法, $\times 100$; 5. 表皮上的果锈结构, $\times 100$; 6. 离析刮片法, $\times 100$; 7. 刮片法, $\times 100$; 8. 直接剥离法, $\times 100$; 9. 透明胶带粘取法, $\times 100$ 。

Plate I Fig. 1. Samplings from *Malus*; Fig. 2~9. Light microscopic observation of *Malus xiaojinensis* fruit epidermal structures prepared with seven different methods; Fig. 2. Nail polish blotting method, $\times 100$; Fig. 3. Boiling peeling scraping method, $\times 100$; Fig. 4. Boiling and peeling method, $\times 100$; Fig. 5. Fruit peel rust of epidermis, $\times 100$. Fig. 6. Acid eduction method, $\times 100$; Fig. 7. Scraping method, $\times 100$; Fig. 8. Directly peeling method, $\times 100$; Fig. 9. Transparent adhesive tape sticking method, $\times 100$.