

# “金野”紫穗槐石蜡切片制作与显微镜观察分析

邹原东<sup>1\*</sup>, 石进朝<sup>1</sup>, 李彦侠<sup>1</sup>, 陈博<sup>1</sup>, 陈志刚<sup>2</sup>, 董耀斌<sup>2</sup>

<sup>1</sup>北京农业职业学院园艺系, 北京

<sup>2</sup>山西孝义林业局, 山西 孝义

收稿日期: 2023年10月25日; 录用日期: 2023年12月29日; 发布日期: 2024年1月9日

## 摘要

为了探究“金野”紫穗槐和紫穗槐细胞横切结构特征, 观察并鉴别“金野”紫穗槐与紫穗槐组织结构的差别, 掌握石蜡切片的制作方法。对“金野”紫穗槐及紫穗槐的叶片制作石蜡切片, 利用体视显微镜进行染色切片观察。本研究发现, “金野”紫穗槐的叶片横切结构完整, 上、下表皮细胞由1层细胞构成, 细胞排列整齐、紧密, 形状及大小清晰可见。栅栏组织由4层圆形细胞构成, 紧密条形堆积排列, 细胞间隙隐约可见。紫穗槐的栅栏组织由2层长圆柱细胞构成, 形状为条形, 边界清楚, 排列整齐, 大小均匀一致; 海绵组织细胞排列分散, 体积与厚度不如栅栏组织, 与栅栏组织区别明显。“金野”紫穗槐的海绵组织由3~4层小圆形细胞构成; 紫穗槐海绵组织较为发达, 由3~4层椭圆形、排列疏松细胞构成。两个品种的维管束细胞排列方式相同、大小与形状相似, 通过对结果的分析可看出“金野”紫穗槐和紫穗槐的细胞真实性及结构上的差异性。

## 关键词

“金野”紫穗槐, 石蜡切片, 栅栏组织, 海绵组织

## Paraffin Sectioning and Microscopic Observation Analysis of *Amorpha fruticosa* “Jinye”

Yuandong Zou<sup>1\*</sup>, Jinchao Shi<sup>1</sup>, Yanxia Li<sup>1</sup>, Bo Chen<sup>1</sup>, Zhigang Chen<sup>2</sup>, Yaobin Dong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Horticulture, Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing

<sup>2</sup>Shanxi Xiaoyi Forestry Bureau, Xiaoyi Shanxi

Received: Oct. 25<sup>th</sup>, 2023; accepted: Dec. 29<sup>th</sup>, 2023; published: Jan. 9<sup>th</sup>, 2024

\*第一作者。

文章引用: 邹原东, 石进朝, 李彦侠, 陈博, 陈志刚, 董耀斌. “金野”紫穗槐石蜡切片制作与显微镜观察分析[J]. 植物学研究, 2024, 13(1): 15-20. DOI: 10.12677/br.2024.131002

## Abstract

In order to explore the cross-sectional structural characteristics of the cells of “Jinye” purple locust and purple locust, observe and distinguish the differences in tissue structure between “Jinye” purple locust and purple locust, and master the method of making paraffin sections. Make paraffin sections of the leaves of “Jinye” purple locust and purple locust, and observe the staining sections using a stereomicroscope. This study found that the transverse structure of the leaves of “Jinye” purple locust is complete, and the upper and lower epidermal cells are composed of one layer of cells. The cells are arranged neatly and tightly, and the shape and size are clearly visible. The palisade tissue is composed of four layers of circular cells, tightly packed in a linear arrangement, with cell gaps faintly visible. The palisade tissue of *Amorpha fruticosa* is composed of two layers of long cylindrical cells, with a linear shape, clear boundaries, neat arrangement, and uniform size; Sponge tissue cells are arranged dispersedly, and their volume and thickness are not as good as those of palisade tissue, which is significantly different from palisade tissue. The sponge tissue of “Jinye” purple locust is composed of 3~4 layers of small circular cells; The sponge tissue of *Amorpha fruticosa* is relatively developed, consisting of 3~4 layers of elliptical and loosely arranged cells. The arrangement of vascular bundle cells in the two varieties is the same, with similar sizes and shapes. Through analysis of the results, it can be seen that there are differences in cell authenticity and structure between “Jinye” purple locust and purple locust.

## Keywords

*Amorpha fruticosa* “Jinye”, Paraffin Section, Palisade Cell, Sponge Tissue

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

紫穗槐(*Amorpha fruticosa* L.)是蝶形花科(Papilionaceae)紫穗槐属(*Amorpha* L.)多年生落叶灌木, 因穗状花序耐寒、耐旱, 适应性强, 是绿化优良树种。“金野”紫穗槐(*Amorpha fruticosa* “Jinye”)是紫穗槐的变种, 为多年生落叶灌木, 新梢金黄色, 基部黄绿色; 一年生冬枝深紫色, 春芽金黄色; 新展叶金黄色, 老叶渐变绿色, 在北京地区常用作观赏树种。国内外关于紫穗槐相关报道多见于栽培、组织培养、育苗养护等方面, 目前未见关于紫穗槐及其变种组织切片方面的研究。本研究为了探究紫穗槐及其变种“金野”紫穗槐在细胞组织结构上的差异, 以“金野”紫穗槐和紫穗槐为试验材料进行石蜡切片制作, 观察两品种叶片的组织横切结构并比较它们的细微差别, 在细胞层面上辨识两个品种组织结构的异同, 以期今后结合外在性状表现有针对性地对“金野”紫穗槐栽培及生态适应性进行研究, 也可以为该品种逆境伤害及环境保护研究提供一定参考。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 供试材料

品种选自北京农业职业学院彩色苗木繁育基地进行种植的“金野”紫穗槐(*Amorpha fruticosa* “Jinye”)和紫穗槐(*Amorpha fruticosa* L.)。以2022年春季新生枝条萌发的新鲜叶片为试验材料。

## 2.2. 主要试剂与仪器

主要试剂：植物 1% 番红固绿染色液，购于武汉赛维尔(Servicebio)生物科技有限公司；中性树胶（中国上海标本模型厂）、无水乙醇(湖南汇虹试剂有限公司)、二甲苯(购于湖南汇虹试剂有限公司)。主要仪器有：JK-6 生物组织摊烤片机(武汉俊杰电子有限公司)、JB-L5 石蜡包埋机(武汉俊杰电子有限公司)、JT-12F 自动组织脱水机(武汉俊杰电子有限公司)、RM2235 轮转式切片机(德国 Leica 公司)、SMZ-171 体视显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司)、显微镜盖玻片(超白玻璃材质，世泰 10212440C)；显微镜粘附载玻片(超白玻璃材质，世泰 188105W)。

## 2.3. 切片制作过程

采集“金野”紫穗槐和紫穗槐(对照)的新鲜完整叶片，不要损伤叶片细胞。将叶片切取成厚度 2 mm，面积为 5 \* 5 m<sup>2</sup> 大小的小叶，随即放入固定液中固定 24 h。本试验采用 FAA 固定液。FAA 固定液又称标准固定液，主要用于植物营养器官(根、茎、叶)和部分生殖器官(花药、子房等)的组织切片，在植物形态解剖学上应用广泛。按其中含有的重要成分 FAA 固定液可分为醛类固定液、醇类固定液、汞类固定液、苦味酸盐类固定液和氧化剂类固定液等。本试验所使用的是 FAA 醛类固定液，主要配方为：50% 酒精 90 mL + 冰醋酸 10 mL + 40% 甲醛 5 mL。这类固定液具有保存剂功效，同时能够破除干扰，保持组织或细胞大小，不会引起植物变形；具有软硬适中、便于切片、更为清晰显现材料本身结构等功能[1]。因其中含有甲醛、冰醋酸等易制毒、刺激性物质，会对人体造成损伤，在使用 FAA 固定液过程中戴好口罩、护目镜，做好防护，保持环境通风，避免气体被吸入到口鼻中。

脱蜡：将试材放入烤片机，于 70℃ 下烘烤 30 min。取出后放入二甲苯溶液中脱蜡 2 次，每次 10 min，共计 20 min；脱蜡后用 100% 乙醇冲洗二甲苯两次，每次冲洗时间 5 min，共计 10 min。二甲苯作为脱蜡剂虽存在毒性，但在保存切片长期性及稳定性方面仍为首选，本切片制作中脱蜡 2 次，不会对制片的质量造成影响[2]。

水化：将脱蜡后试材分别在 95%、85%、75% 乙醇中水化 5 min，水化后将试材放入蒸馏水中待用。将脱蜡试材转入乙醇中，在空气停留的时间要短，防止切片发白影响后续染色效果[3]。

染色：用 1% 番红染色液对试材染色 1~2 h，之后用流水稍洗；再用固绿染色液染色 3~5 min。番红是碱性染料能显示维管束植物木质化、木栓化和角质化的组织。固绿是酸性染料，是一种含有浆质的纤维素细胞组织的酸性染色剂。植物组织中的导管可以被番红染色，筛管可以被固绿染色。有研究表明[4]，用 1% 番红染色剂对黄瓜茎染色 24h，内部组织结构看起来会更清晰。本试验考虑到切片用番红染色时间过长，会导致背景的深红色不易分化掉；而固绿染色时间过长，会覆盖其他被番红染色的叶片组织结构。因此，本试验将染色时间调整为上述时间。

脱水：用无水乙醇脱水两次，每次不超过 10 min，这样既能避免过长时间的无水乙醇接触使组织变脆的风险，又能保证脱水彻底[5]，去除样片中多余的水分[6]。

透明：常用的透明剂有苯、甲苯、二甲苯等。同脱水一样，组织在透明剂中停留时间过易变脆，因此本试验用二甲苯透明两次，每次不超过 10 min。透明的最终效果是用肉眼看叶片组织通透、明亮，使得组织在切片时图像更加详细明了。

包埋：包埋是将经过固定、脱水等环节处理的组织填充在包埋框内并包埋成块，使组织和包埋剂融为一体以便于进行后续的切片。本试验所使用的包埋剂为 OCT 包埋剂(optimal cutting temperature compound)，一种聚乙二醇和聚乙烯醇的水溶性混合物。这种包埋剂水溶性较好，在制作切片时利于保持植物组织的支撑力和持续性，改善切片质量。在石蜡包埋机上进行包埋，将通过 60℃ 融化过的石蜡倒入包埋框内，将“金野”紫穗槐及紫穗槐叶片的组织结构埋在石蜡中，并用数字编号将组织的先后顺序区分

开来，整个过程控制在 30 min 之内。注意包埋剂的使用及包埋时间的处理，包埋时间过长会导致后续切片较为不便[7]。融化石蜡时选择较为适宜的温度，更利于组织的渗透，石蜡的硬度要与组织的硬度相符合，组织的放置方向应一致。

切片和封片：用轮转式切片机将试材固定、整修，保持叶片组织结构处在适宜切片的角度，调整组织的方向及位置，去除多余的组织和石蜡，把带有组织的石蜡块整修成规则形状。将石蜡块固定在切片机上，调整好切片机的切片厚度进行切片，整个过程动作要娴熟，速度要适中。切片后在石蜡切片的中央滴加一滴中性树胶，盖上盖玻片封固。封片时要尽量缩短时间，动作要快，不用手接触切片，避免而使组织长间接接触空气或者人为呼吸影响内部气泡产生[8]。

#### 2.4. 测定指标

利用体视显微镜进行植物的表皮、叶肉和叶脉染色切片结构观察，并详细标注表皮、栅栏组织、海绵组织、维管束等叶片结构位置。

### 3. 结果与分析

从图 1、图 2 的叶片横切结构可以看出，2 个紫穗槐品种的叶片由表皮、叶肉和叶脉组成，上、下表皮细胞均具有 1 层细胞，细胞形状无太大差异，以长方形、椭圆形为主。但从叶片结构形态尤其是叶肉细胞上进行比较，2 个品种又存在较为明显差异。

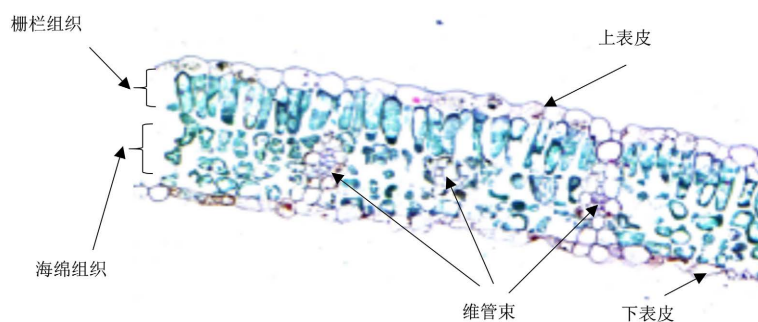


Figure 1. Leaf tissue structure of *Amorpha fruticosa*

图 1. 紫穗槐叶片组织结构

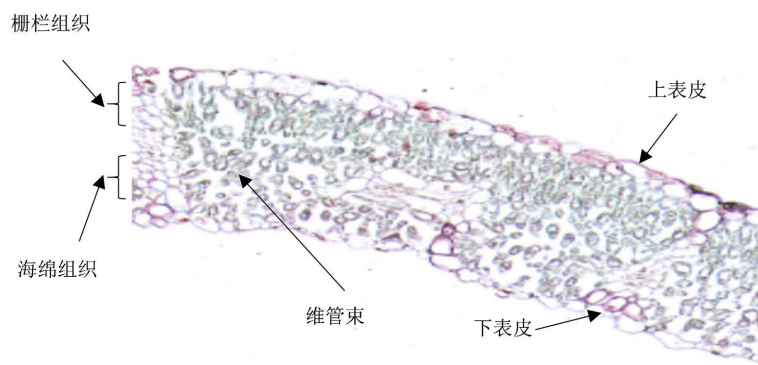


Figure 2. Leaf tissue structure of *Amorpha fruticosa* "Jinye"

图 2. “金野”紫穗槐叶片组织结构

紫穗槐的上表皮细胞由长方形细胞构成，细胞排列较为紧实、整齐，相互之间无空隙，大小均匀一致；下表皮细胞的排列虽不如上表皮的整齐，但大小清晰可见，细胞之间的排列紧密有序，形状近似长

方形、不规则圆形。上、下表皮细胞宛如两条锁链紧紧锁住内部的叶肉细胞。“金野”紫穗槐的上、下表皮细胞形状多为长方形，也有部分呈椭圆形，上表皮细胞的排列比下表皮细胞整齐。

位于上、下表皮细胞之间的是叶肉细胞，其内部含有大量的叶绿体，也是植物进行光合作用的主要部位。紫穗槐叶肉细胞清晰可见，尤其是内部的栅栏组织和海绵组织分化更加明显。栅栏组织由2层长圆柱细胞构成，整体呈多层条形排列，细胞之间排列整齐，较为严实紧密；细胞边界清晰，大小均匀一致。“金野”紫穗槐的栅栏组织由4层左右小圆形细胞构成，细胞排列紧实且为条带状，呈现密实条形堆积状态，细胞间隙隐约可见。同海绵组织相比，两个品种的栅栏组织具有更加规则，形状更加明显的细胞构成，细胞体积及厚度明显优于海绵组织，这同邓慧群[9]等的研究一致。同“金野”紫穗槐相比，紫穗槐栅栏组织细胞大小、形状、层数、体积等差别较为明显。聂江力等[10]研究表明，栅栏组织作为叶肉细胞内部光合作用的主要部位，细胞形状越大，厚度越厚，光合作用越强；同时，栅栏组织的厚度及层数可反应植物在抗寒抗旱方面的能力，抗性强的品种栅栏组织排列紧密且细胞发达，可以在一定程度上减少蒸腾，锁住水分，防止叶片在强光下灼伤，相应地提高了植物机体防御病虫害和抵御逆境的能力。

叶肉细胞内除了栅栏组织外，还有海绵组织。海绵组织由一系列排列疏松、不规则的薄壁细胞构成，一般存在于栅栏组织的下方，靠近下表皮[11]。海绵组织是进行气体交换的场所，也能进行光合作用，与栅栏组织的分化程度在一定程度上在预测植物在强日照下适应性以及逆境条件下生存能力[12][13]。本研究发现，无论“金野”紫穗槐还是紫穗槐，海绵组织同栅栏组织相比，都具有细胞小、不规则、细胞间隙大等特点。但品种之间差别明显。紫穗槐海绵组织发达，由3~4层小圆形、椭圆形细胞构成，细胞排列疏松，细胞间空隙较大，能清晰地和栅栏组织区分开来。“金野”紫穗槐的海绵组织由3~4层小圆形细胞构成，层次感不够分明，细胞排列疏松，从整齐程度、细胞间隙的大小能和栅栏组织区分开来。

#### 4. 讨论

石蜡切片作为一种观察细胞横切细胞结构的常用方法，操作方法简单，检测程序便捷，常用在植物细胞学及组织学等学科领域的研究上。随着各种先进仪器的不断问世，切片制作的新技术与新方法也不断出现，这也为切片制作向更高端、向更深入的分子水平迈进。通过细胞学先进的技术手段对“金野”紫穗槐细胞组织结构的检测，既可以了解不同生育时期“金野”紫穗槐各个组织器官的结构与形态，真正弄清生长发育的机制；又可以联系植物自身外在的生长表现，来鉴定机体抵抗外界不良条件的能力，为该品种在园林绿化、观赏品鉴、生态修复、环境保护等方面提供理论借鉴。

“金野”紫穗槐作为紫穗槐的变种，两者的外在表现差异无几，利用石蜡切片进行内部组织的真实性的观察，找寻“金野”紫穗槐和紫穗槐的详细结构特征，鉴别品种之间的细微不同，在鉴别两者之间的差别方面更具有说服力，也为品种间的后续鉴定提供理论支撑。植物叶片中的维管束呈束状结构排列，由木质部和韧皮部成；多个维管束连接形成维管束系统，构成叶脉，为植物输送水分和营养的通道，有支撑植物机体作用[14]。维管束中的维管束壳的厚薄、维管束的宽度与长度也影响着植物的倒伏程度[15]。植物的茎及叶片维管束数量的多少及厚度的大小决定着机体抗旱能力的大小[16]。

#### 5. 讨论

本研究显示，2种紫穗槐品种具有相似的结构特征，比如上、下表皮细胞排列整齐而紧密，叶肉细胞构成相同，栅栏组织和海绵组织的分层明显，这也说明“金野”紫穗槐在遗传性上与紫穗槐具有一致性。但2品种之间的差异也明显，相比“金野”紫穗槐，紫穗槐叶肉细胞具有较为发达的栅栏组织和海绵组织，两者之间分化明显，两类组织的层次感明显；而“金野”紫穗槐的栅栏组织排列紧密但整齐度不如紫穗槐，栅栏组织和海绵组织分化的不明显，仅能从堆积状态和疏松程度来判读两类叶肉组织的位

置关系。从以上的表现可以看出,紫穗槐叶片结构中发达的栅栏组织和海绵组织更能促使叶片高效的利用光能,进行呼吸,提高光合作用能力。

紫穗槐的维管束被染成红色,清晰可见,嵌入在叶肉细胞中,被栅栏组织和海绵组织包围,上部靠近栅栏组织,下部紧邻下表皮细胞,成椭圆形聚集状态,这与沈菽荻等[17]研究一致;维管束细胞发达,外侧细胞较厚,内部细胞较薄,为无限生长型,与栅栏组织和海绵组织细胞的界限明显;多个维管束构成维管束系统。“金野”紫穗槐的叶肉细胞的维管束染色后显示不明显,较难分辨,隐约看到成聚集束状结构的细胞堆积在一起,细胞形状、大小及排列方式与紫穗槐相似。后续可从表皮细胞的薄厚、叶肉细胞的层数与厚度、维管束内部组成的比例与结构大小等遗传差异性方面进行深入研究。

本研究利用石蜡切片去观察两类紫穗槐品种的组织结构,探究两者之间的组织结构异同。但在制作过程中也发现了一些问题,导致制作过程及显像处理效果不佳。现将具体问题归纳如下:1)固定的环节较为重要,对切片的形成和染色影响较大。在对紫穗槐品种取样时要注意以下因素与固定液效果的关系,这些因素包括叶片组织的厚度、取样后要及时固定、固定液的PH范围、固定时间的长短、适合的温度等。2)背景染色呈现深红色:可能由于切片在染液中染色时间过长,导致背景的深红色不易分化掉。3)切片染色过浅:可能与植物切片染色后在低浓度酒精中放置时间过长导致褪色有关。4)切片染色后显微镜观察拍照后模糊不清:可能与切片包埋蜡温度过高或脱水透明不彻底有关。上述问题在今后的深入研究中逐步摸索并改进。

## 基金项目

北京市科技计划项目“‘金野’紫穗槐性状基因标记的研究”,基金编号:(KM202012448003)。

## 参考文献

- [1] 王原媛,张定宇,黄春国.植物石蜡切片的固定与保存[J].安徽农学通报,2010,16(1):198-200.
- [2] 陈涛,杨通,何炼图,等.探讨二甲苯脱蜡的量化使用方法[J].临床与病理杂志,2015,35(2):238-242.
- [3] 王婉,申跃武,梁素华,等.洋葱根尖细胞有丝分裂石蜡制片的探讨[J].技术与市场,2009,16(4):57.
- [4] 康云艳,宋爱婷,柴喜荣,等.黄瓜幼苗茎段石蜡切片制作和番红染色实验方法改进[J].实验技术与管理,2022,39(1):182-184,190.
- [5] 郭林芝,王晓晖,岳丹,等.白色脂肪组织和棕色脂肪组织石蜡切片脱水程序的效果比较[J].山西医科大学学报,2020,51(2):182-185.
- [6] 陈舒忆,唐艺,莫我跃.竹叶花椒的石蜡切片方法研究[J].科技视界,2020(16):197-198.
- [7] 陈林,王清隆,王祝年.海南龙血树茎干石蜡切片技术的研究[J].安徽农业科学,2017,45(10):5-7,21.
- [8] 王心可,郭庆梅.冰冻切片技术在高等植物中的应用[J].植物生理学报,2021,57(5):1047-1054.
- [9] 聂江力,裴毅,杨雪君,等.槐叶的性状与显微鉴别[J].中药材,2015,38(5):970-971.
- [10] 邓慧群,全程,张炎生,等.广西野生茶树叶片横切结构及特性分析[J].中国农学通报,2022,38(19):47-53.
- [11] 张咏梅,马晖玲,唐云智.紫花苜蓿叶片受白粉病菌侵染后结构的变化[J].草业学报,2017,26(2):88-94.
- [12] 任尚福,吕光辉.不同生境西伯利亚白刺叶片解剖结构研究[J].中国野生植物资源,2020,39(9):1-5.
- [13] 林重阳.茶树叶片解剖结构的分析和相关特性的预测[J].广东茶叶,2022,(2):24-31.
- [14] 金敏,张倩,任丹丹,等.花期摘叶和摘萼片对库尔勒香梨维管束发育影响及与萼筒脱落的关系[J].新疆农业科学,2020,57(9):1662-1673.
- [15] 江文,高美萍,陈丽娟,等.荸荠叶状茎形态解剖结构与抗倒伏性比较分析[J].中国瓜菜,2023,36(3):48-53.
- [16] 刘新雨,田洁,杨世鹏,等.菊芋营养器官解剖结构及其与抗旱性的关系[J].分子植物育种,2020,18(10):3402-3409.
- [17] 沈菽荻,吴艳,刘利,等.6个种源地不同桑树品种叶柄解剖结构与水分运输能力初探[J].蚕业科学,2019,45(1):1-8.