

栲树叶片 SEM 样品制备

胡华强^{1,2}, 胡晓颖¹, 孙 晔^{1,3*}

(1. 中国科学院 华南植物园, 广州 510650; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049; 3. 中国科学院 华南植物园植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650)

摘要: 栲树叶片下表皮覆盖着一层密集的薄壁盾状毛影响了对叶表面特征观察。经 FAA 固定→二甲苯和丙酮的混合液(1:1)浸泡→恒温金属浴加温→超声波(50~60 Hz, 90 W)振荡器→系列酒精浓度脱水处理后, 叶表面薄壁盾状毛脱落, 在 SEM 扫描电子显微镜下可观察到叶表皮形态结构(气孔器, 细胞排列及近圆形的毛基)。此方法操作简便、效果明显, 并且安全和无污染。

关键词: 栲树叶片; 薄壁盾状毛; SEM; 样品制备

中图分类号: Q336 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2012)01-0053-03

SEM sample preparation for leaf epidermis of *Castanopsis fargesii*

HU Hua-Qiang^{1,2}, HU Xiao-Ying¹, SUN Ye^{1,3*}

(1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049; 3. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: The lower epidermis of the leaves of *Castanopsis fargesii* (Fagaceae) covered densely with thin-walled peltate trichomes gave rise to difficulty for the observation of its micromorphological characteristics. The thin-walled peltate trichome was shed off when the leaves were treated with FAA solution and a mixture of dimethylbenzene and acetone(1:1), followed by shaking in an ultrasonic wave bath(50—60 Hz, 90 W) and rinsing with a series of ethanol concentration. The micromorphological characteristics of leaf epidermis could be shown clearly under the scanning electronic microscope(SEM). This method was very effective and easy to operate, furthermore, it was safe and non-polluted.

Key words: leaf epidermis; thin-walled peltate trichomes; Scanning Electronic Microscope; sample preparation

栲树(*Castanopsis fargesii*)属壳斗科(Fagaceae)栲属, 是亚热带常绿阔叶林中的主要建群种和优势种, 广泛分布于我国亚热带区域, 具有重要的经济与生态价值(吴征镒, 1980; 闫淑君等, 2002; 宋萍等, 2003)。栲树林是我国常绿阔叶林的主要类型, 对于以栲树为建群种的群落结构以及遗传多样性方面已

开展了较为深入的研究(刘智慧, 1990; 徐立安等, 2001; Zhu 等, 2002; 叶万辉等, 2004), 但对于栲树叶表皮特征的研究却鲜有报道。研究栲树叶表皮特征, 对栲树植物分类以及阐释栲树群落生态和群体分布的格局具有重要意义。

扫描电子显微镜(SEM)技术目前已广泛应用

收稿日期: 2011-05-09 修回日期: 2011-09-17

基金项目: 国家自然科学基金(30871959); 中国科学院生命科学领域基础前沿研究专项(KSCX2-EW-J-28); 中国科学院仪器设备功能开发技术创新项目(yg2010079)[Supported by National Natural Science Foundation of China(30871959); Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences(KSCX2-EW-J-28)]

作者简介: 胡华强(1983-), 男, 河北邯郸市人, 硕士, 从事植物学研究工作, (E-mail)huhq05@gmail.com。

* 通讯作者: 孙晔, 男, 甘肃永昌县人, 博士, 从事进化植物学研究, (E-mail)sun-ye@scbg.ac.cn。

于植物比较形态学研究,但由于新鲜的栲树叶下表皮覆盖着一层薄壁盾状毛,这些薄壁盾状毛密集分布在角质层上,制片中难以剥离,因而无法观察栲树叶下表皮的形态特征,如气孔器的形状,表面是否光滑,表皮细胞的垂周细胞壁的轮廓等(Jones, 1986; Liu等, 2009)。为了去除表皮薄壁盾状毛,同时又不影响叶表面形态结构,经过几个月方法摸索,我们筛选出了一种非常好的处理方法,在此做一介绍。

1 材料和方法

取新鲜植物叶片放于 FAA 固定液(每 100 mL 固定液中含 70% 酒精 90 mL、5 mL 冰醋酸、5 mL 甲醛)保存。将叶片切小,长宽 1~0.8 cm(5~8 片),放入 5 mL 的离心管中,加入二甲苯和丙酮的混合液(1:1),放置于 JS-400 A 恒温金属浴中定温至 70 °C,加热 24~28 h,然后放入 1510 BRANSON 中超声波(50~60 Hz, 90 W)振荡 2 h。再依次用 30%、50%、70%、80%、90% 的乙醇进行逐级脱水。其中用 30%、50% 乙醇脱水每次 20 min,加入 70% 乙醇置于 1510 BRANSON 中超声波(50~60 Hz, 90 W)振荡 1 h,80%、90% 的乙醇脱水时间为 20 min。然后用无水乙醇脱水 3 次,每次 10 min,更换叔丁醇 3 次,每次 10 min,最后放入-20 °C 冰箱内 2 h 以上。将样品取出后放入 JFD-310 中进行临界点干燥,干燥后用双面胶贴在样品台上,用 JFC-1600 离子溅射镀金膜 10 nm,利用 JSM-6360 LV 扫描电子显微镜进行观察并拍照。以未经处理的叶片作对照。

2 结果与分析

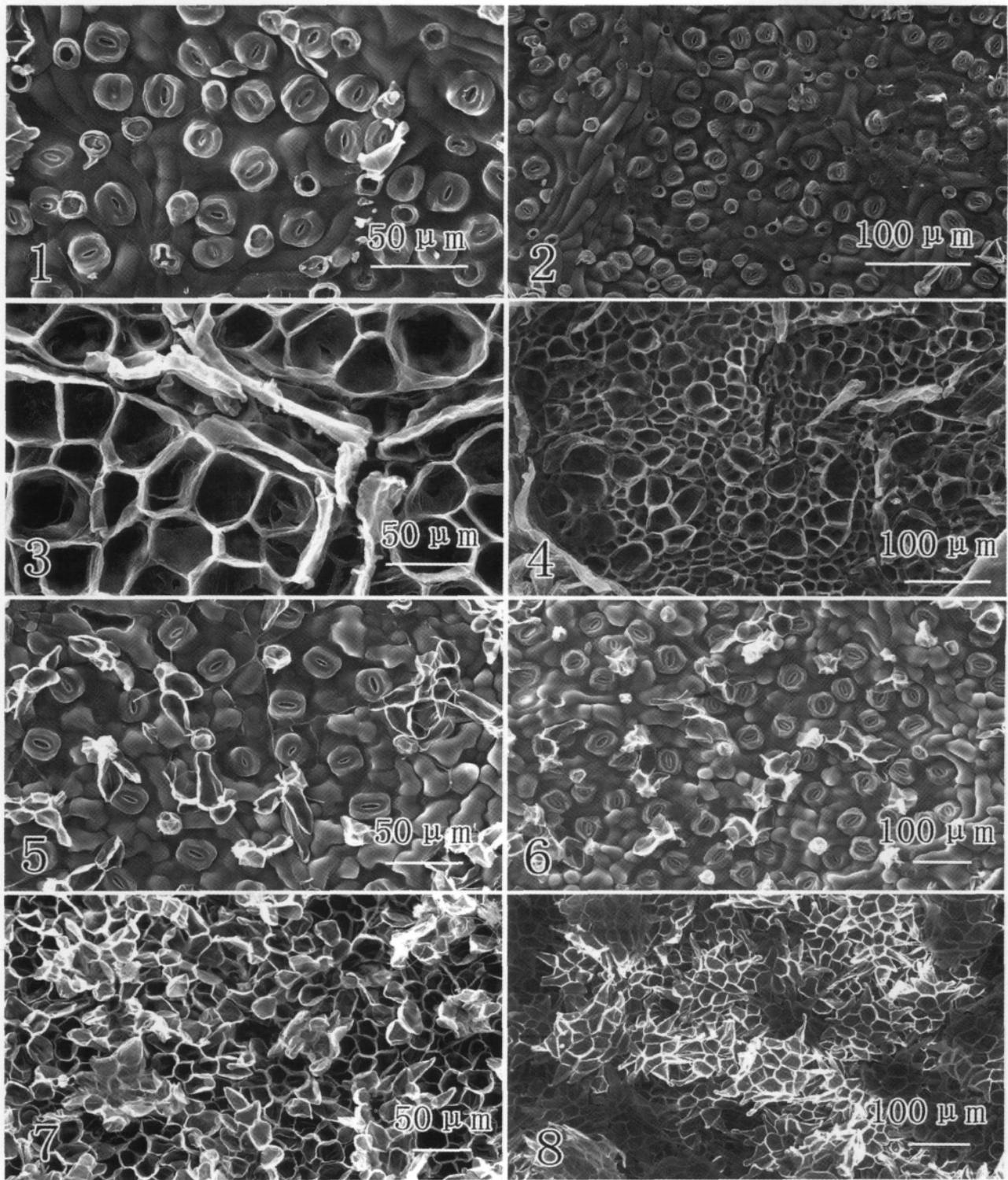
用此方法处理后,栲树叶表面的绝大部分表皮毛脱落,叶表面清洁,表皮细胞排列清晰,气孔器上保卫细胞和副卫细胞形状非常明显,且能看见近圆形的表皮毛脱落后所形成的毛基(图版 I:1,2)。为了证明上述方法结果比较理想,我们用析液(10% 铬酸:10% 硝酸=1:1)进行表皮剥离发现,叶表皮正反两面都无法观察到叶表皮形态结构(图版 I:3,4)。通过调节恒温金属浴温度和加热时间及超声波震荡时间的方法进行多次实验,发现叶表皮形态仍留有大量表皮毛(图版 I:5,6)。因此,这些方法都无法用 SEM 对栲树叶表皮形态结构进行观察和拍照。

3 结论与讨论

薄壁盾状毛紧密地附着在栲树叶下表皮且难以去除(图版 I:7,8),目前尚无报道说明如何去除表皮毛以便于通过扫描电子显微镜观察叶表皮的结构。用常规弱酸弱碱液进行处理后,薄壁盾状毛与叶表皮不能分开,仍然难以达到预期的效果。通过多次对比试验发现,在进行二甲苯和丙酮混合液(1:1)浸泡,提高温度和加热时间以及延长在水浴超声波振荡器的时间可以有效地去除叶表皮的薄壁盾状毛。关键技术是要掌握好二甲苯和丙酮混合液(1:1)浸泡的时间和温度,时间过短或温度过低会使薄壁盾状毛无法脱去,时间过长或温度过高易破坏细胞结构。本研究发现,浸泡温度控制在 70 °C,时间为 24~28 h 时去除叶表皮薄壁盾状毛的效果最佳。利用水浴超声波振荡器可以起到清洗、分散作用,掌握适当的时间,防止叶表皮细胞结构的破碎。总之,此方法具有操作简单、处理时间短、化学试剂用量少、安全无污染等优点。栲树叶片经此方法处理后利用扫描电子显微镜可非常清晰地观察到叶表皮微形态特征,可为需要做类似实验的植物学工作者提供有益的参考。

参考文献:

- 刘智慧. 1990. 四川省缙云山栲树种群结构和动态的初步研究[J]. 植物生态学与地植物学学报, 14(2): 120-128
- 宋萍, 洪伟, 吴承祯等. 2003. 中亚热带丝栗栲次生林群落高度级结构分析[J]. 应用与环境生物学报, 9(5): 460-464
- 徐立安, 李新军, 潘惠新, 等. 2001. 用 SSR 研究栲树群体遗传结构[J]. 植物学报, 43(4): 409-412
- 闫淑君, 洪伟, 吴承祯等. 2002. 丝栗栲种群生命过程及谱分析[J]. 应用与环境生物学报, 8(4): 351-355
- 叶万辉, 练璐璐, 曹洪麟. 2004. 中国栲属植物建群种地理分布与替代规律分析[A]. 见: 中国科学院生物多样性委员会. 中国生物多样性保护与研究进展第五届全国生物多样性保护与持续利用研讨会论文集[C]. 281-287
- 吴征镒. 1980. 中国植被[M]. 北京: 科学出版社: 54-57
- Jones JH. 1986. Evolution of the Fagaceae: The implications of floral feature[J]. Ann Mo Bot Gard, 73(2): 228-275
- Liu MQ, Deng M, Zhou ZK. 2009. Taxonomic and ecological implications of leaf cuticular morphology in *Castanopsis*, *Castanea* and *Chrysolepis*[J]. Plant Syst Evol, 283(1): 111-123
- Zhu QH(朱其惠), Pan HX(潘惠新), Zhuge Q(诸葛强), et al. 2002. Analysis of genetic structure of natural populations of *Castanopsis fargesii* by RAPDs(栲树天然群体遗传结构的 RAPD 分析)[J]. Acta Bot Sin(植物学报), 44(11): 1321-1326



图版 I 扫描电镜下栲树叶表皮照片 1,2. 70 °C 恒温 24 h 及超声波震荡 2 h 后栲树叶片下表皮照片; 3,4. 离析液(10% 铬酸 : 10% 硝酸 = 1 : 1) 进行表皮剥离后栲树叶片下表皮照片; 5,6. 分别为 70 °C 恒温 5 h 及超声波震荡 10 min, 70 °C 恒温 10 h 及超声波震荡 30 min 后栲树叶片下表皮照片; 7,8. 未经处理的叶片下表皮照片。

Plate I Leaf epidermis of *Castanopsis fargesii* observed under scanning electron microscope 1,2. Leaf epidermis treated by heating for 24 h at 70 °C and shaking for 2h in a ultrasonic wave bath; 3,4. Leaf epidermis treated with analytical solution(10% chromic acid : 10% Nitric acid = 1 : 1); 5,6. Leaf epidermis treated by heating for 5 h at 70 °C and shaking for 10min, and heating for 10 h at 70 °C and shaking for 30 min, respectively; 7,8. Untreated leaf epidermis.