

杨国一,于文涛,蔡春平,等. 茶树叶片扫描电镜样品制备方法的比较研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(3):95-98.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.03.024

茶树叶片扫描电镜样品制备方法的比较研究

杨国一¹, 于文涛², 蔡春平², 陈 笛¹, 谢微微¹, 王鹏杰¹, 叶乃兴¹

(1. 福建农林大学园艺学院/茶学福建省高等学校重点实验室, 福建福州 350002; 2. 福建出入境检验检疫局, 福建福州 350001)

摘要:为研究不同样品制备方法对茶树叶片扫描电镜观察的影响,选用3个茶树品种的老叶和嫩叶,分别用烘箱干燥法、硅胶干燥法和真空冷冻干燥法进行处理。对茶树老叶的扫描电镜观察中发现,烘箱干燥法和真空冷冻干燥法处理后的样品背腹面的微形态特征均保存完好,硅胶干燥法处理后部分样品气孔密度异常;在对茶树嫩叶的观察中发现,采用烘箱干燥法和硅胶干燥法处理后的样品背、腹面均发生严重的皱缩,气孔密度增加,而采用真空冷冻干燥法处理后的样品微形态特征自然,能表现出真实的叶表微形态特征。因此,在茶树品种微形态学等相关研究中,对于老叶研究材料,建议采用烘箱干燥法进行扫描电镜样品制备;对于嫩叶研究材料,建议采用真空冷冻干燥法进行扫描电镜样品制备。

关键词:茶树;叶片;电镜扫描;干燥处理;样品制备

中图分类号: S571.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)03-0095-04

应用扫描电镜观察生物样品表面的微形态特征,以获得较光学显微镜观察结果更为细微的结构特征,得到具有特异性功能的微观结构和具有分类学意义的微形态性状^[1-4],是

生物学研究的重要手段之一。在利用扫描电镜对生物样品的微形态进行观察分析研究中,能否获得真实、清晰、理想的扫描电镜观察结果,样品的制备过程是关键,绝大多数情况需要对生物样品进行干燥处理后才能镀金和进行扫描电镜观察^[5]。样品的前期干燥处理直接影响后期观察效果,如果处理不好,会直接影响到观察的清晰度与准确度,甚至直接导致试验失败^[6]。含水量较多的生物样品不仅对扫描电镜成像造成很大的影响,同时对扫描电镜仪器设备也会造成诸多不良后果^[7]:样品含水量多容易造成样品仓内真空度下降,造成电子束偏移,使图像模糊不清;造成物镜、镜头、光阑等部件的污染;灯丝碰到水蒸气而氧化变质乃至熔断。目前,植物叶片电镜扫描研究中的干燥方法主要有烘箱干燥法^[8-9]、自然

收稿日期:2017-01-12

基金项目:福建省“2011协同创新中心”中国乌龙茶产业协同创新中心专项(编号:闽教科[2015]75号);福建检验检疫局科技计划(编号:FK2014-02)。

作者简介:杨国一(1989—),男,河南新乡人,硕士研究生,主要从事茶学育种与种质资源研究。E-mail:495718283@qq.com。

通信作者:叶乃兴,教授,主要从事茶树栽培育种与资源利用研究, E-mail:ynxtea@126.com;于文涛,博士,农艺师,主要从事植物系统学研究, E-mail:wtyu@foxmail.com。

[3] 顾定武. 曲靖市麒麟区生态林业建设的成就和展望[J]. 林业调查规划,2003,28(4):35-38.

[4] 杨捷频. 常规石蜡切片方法的改良[J]. 生物学杂志,2006,23(1):45-46.

[5] 刘桂芝. 石蜡切片标本的制作过程[J]. 通化师范学院学报,2004,25(11):90-91.

[6] 陈海明,芮菊生,唐静华. 番红 O 和固绿 FCF[J]. 生物学杂志,1989(2):33-34.

[7] 华中农学院植物教研室植物显微技术组. 爱氏苏木精整体染色及番红-固绿双重滴染法在石蜡切片中的运用[J]. 植物学通报,1984,3(6):56-59.

[8] 吴清韩,朱 慧,马瑞君,等. 入侵植物南美螞蛄菊营养器官的形态解剖研究[J]. 生态环境学报,2014,23(6):958-961.

[9] 王桂芹,赵 岩,段亚军. 高山红景天解剖学研究[J]. 植物研究,2004,24(1):93-95.

[10] 张格成,李继祥,陈秀华. 空心莲子草主要生物学特性研究[J]. 杂草科学,1993(2):10-12.

[11] 娄远来,王庆亚,邓渊征,等. 空心莲子草根中异常结构及不定芽的发育解剖学研究[J]. 广西植物,2004,24(2):125-127.

[12] 吴玉树,余国莹. 根生沉水植物菹草(*Potamogeton crispus*)对滇

池水体的净化[J]. 环境科学学报,1991,11(4):411-416.

[13] 李 晶,高玉葆,郑志荣,等. 内蒙古高原不同生境三种锦鸡儿属植物的水力结构特征及其对环境因子的响应[J]. 生态学报,2007,27(3):837-845.

[14] Sperry J S, Tyree M T. Mechanism of water stress-induced xylem embolism[J]. Plant Physiology, 1988, 88(3):581-587.

[15] 郑师章,乐毅全,吴 辉,等. 凤眼莲及其根际微生物共同代谢和协同降酚机理的研究[J]. 应用生态学报,1994,5(4):403-408.

[16] 李芳兰,包维楷. 植物叶片形态解剖结构对环境变化的响应与适应[J]. 植物学通报,2005,22(增刊1):118-127.

[17] 闫翠香,邵小明,丁新泉,等. 掌叶覆盆子营养器官解剖结构及其特征分析[J]. 北方园艺,2015(20):134-138.

[18] 蔡志全,齐 欣,曹坤芳. 7种热带雨林树苗叶片气孔特征及其可塑性对不同光照强度的响应[J]. 应用生态学报,2004,15(2):201-204.

[19] 初敬华,高晨光,朱秋广,等. 3种水生植物营养器官的比较解剖学研究[J]. 松江学刊(自然科学版),2001(2):47-49.

[20] Antonielli M, Pasqualini S, Batini P, et al. Physiological and anatomical characterization of *Phragmites australis* leaves [J]. Aquatic Botany, 2002, 72(1):55-66.

干燥法^[10-12]、真空冷冻干燥法^[13-16]等方法。

对于茶树叶片来说,茶树老叶和嫩叶含水量、角质层和上下表皮厚度都有所差异^[17],不同的叶片适合哪种干燥方式,还没有确切的数据支持。为了探讨茶树老、嫩叶片对应的最优干燥方法,本研究选取3个品种的茶树叶片为研究对象,每个茶树品种取老叶以及嫩叶作为试验材料,用场发射扫描电镜观察,然后对3种不同的茶树叶片扫描电镜样品制备方法进行比较,旨在寻找一种理想的茶树叶片扫描电镜样品制备方法,为茶树品种叶片微形态比较研究、茶树叶片发育过程的微形态研究等提供试验依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

试验材料采自福建农林大学教学茶园的3个品种(表1)的茶树叶片,分别为春梢叶(老叶)和秋梢第3叶(嫩叶),采样时间为2016年10月下旬。

表1 3种茶树品种的性状描述

品种	树型	叶片大小	营养芽物候期
本山	灌木	中叶	中生
黄旦	小乔木	中叶	早生
铁观音	灌木	中叶	晚生

1.2 仪器设备

SU-8010型冷场发射扫描电镜(日立公司,日本);E-1010型离子溅射镀膜仪(日立公司,日本);DHG-9240A型可编程电热烘箱(上海一恒科学仪器有限公司,中国);FD-1-50型真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司,中国);KQ-300VDE型超声波清洗仪(江苏昆山舒美超声仪器有限公司,中国)。

1.3 试验方法

每个茶树品种选取老叶及嫩叶,用超声波清洗仪去除茶树叶片表面的杂质,于同一叶片中部选取3个2 mm×2 mm大小的部分叶片作为试验材料,分别进行烘箱干燥法、硅胶干燥法和真空冷冻干燥法处理。

烘箱干燥法:将清洗过的茶树叶片样品放入60℃烘箱中干燥4 h。

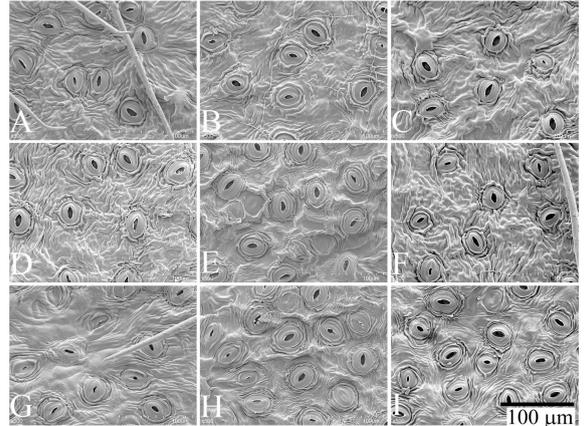
硅胶干燥法:将清洗过的茶树叶片样品直接放入硅胶中进行干燥处理12 h。

真空冷冻干燥法:用2.5%的戊二醛于4℃冰箱中固定3 h;用0.1 mol/L、pH值6.8的磷酸缓冲液冲洗3次,每次10 min;分别用50%、70%、80%、90%乙醇进行脱水,每次15 min;用无水乙醇脱水3次,每次15 min;最后将材料置于100%纯叔丁醇中浸泡15 min后放入真空冷冻干燥机进行干燥处理。

将3组样品观察面向上,用导电胶带固定于扫描电镜样品台上,用离子溅射镀膜仪在样品表面镀膜80 s。冷场发射扫描电镜取8.0 mm工作距离,20 μA灯丝电流、6 kV加速电压,在200倍和500倍放大倍数下对茶树叶片进行观察并拍照。每个处理在200倍放大倍数下取10个视野,对视野中的叶片气孔数量进行统计,用SPSS 20.0软件进行单因素方差分析。

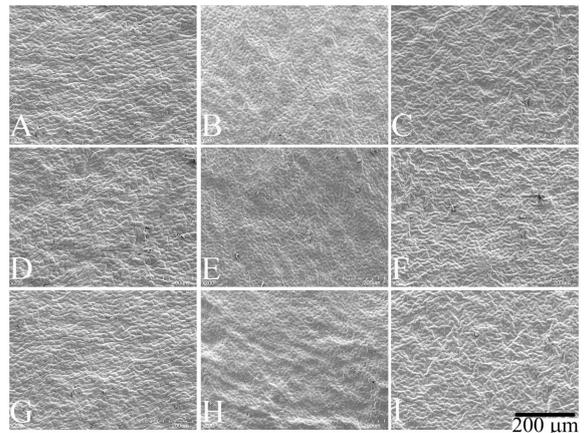
2 结果与分析

由显微图像(图1、图2、图3、图4)可以看出,3个品种的茶树叶片背面均有毛被,为单毛;气孔均为复唇型气孔,长卵形且具有腺鳞组织,气孔器保卫细胞蜡质纹饰平滑。茶树老叶气孔器保卫细胞均凸出于普通表皮细胞,气孔器外围覆有2层皱脊,内层呈平滑、环状闭合,外层褶皱、环状不闭合,副卫细胞与普通表皮细胞在同一平面;茶树嫩叶气孔器保卫细胞略突出于普通表皮细胞,气孔器外围覆有1层皱脊,呈平滑、环状闭合,副卫细胞略低于普通的表皮细胞。



A—本山,烘箱干燥;B—黄旦,烘箱干燥;C—铁观音,烘箱干燥;D—本山,硅胶干燥;E—黄旦,硅胶干燥;F—铁观音,硅胶干燥;G—本山,真空冷冻干燥;H—黄旦,真空冷冻干燥;I—铁观音,真空冷冻干燥

图1 茶树老叶背面微形态特征



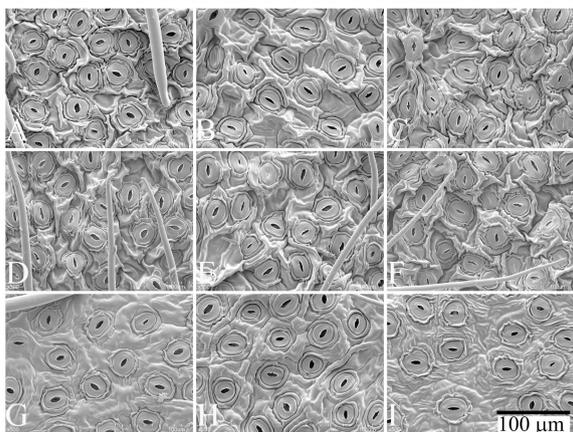
A—本山,烘箱干燥;B—黄旦,烘箱干燥;C—铁观音,烘箱干燥;D—本山,硅胶干燥;E—黄旦,硅胶干燥;F—铁观音,硅胶干燥;G—本山,真空冷冻干燥;H—黄旦,真空冷冻干燥;I—铁观音,真空冷冻干燥

图2 茶树老叶腹面微形态特征

2.1 茶树叶表面纹饰与变化

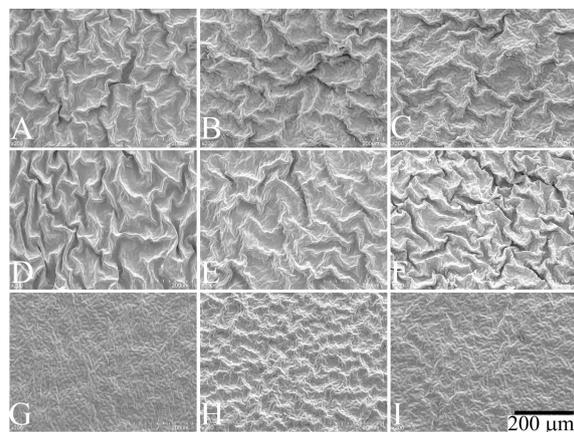
由表2可知,不同茶树品种叶片腹面均有独特的纹饰特征,而相同的茶树品种经不同干燥方法处理后,微形态特征存在差异。

烘箱干燥法:3个品种的茶树叶片经过烘箱干燥处理后,在扫描电镜观察下,茶树老叶原始形态保存良好,可以反映真实的微形态特征。而茶树嫩叶表面发生较为严重的收缩,叶片腹面褶皱较为严重,其表面纹饰均不能反映其真实的微形



A—本山, 烘箱干燥; B—黄旦, 烘箱干燥; C—铁观音, 烘箱干燥; D—本山, 硅胶干燥; E—黄旦, 硅胶干燥; F—铁观音, 硅胶干燥; G—本山, 真空冷冻干燥; H—黄旦, 真空冷冻干燥; I—铁观音, 真空冷冻干燥

图3 茶树嫩叶背面微形态特征



A—本山, 烘箱干燥; B—黄旦, 烘箱干燥; C—铁观音, 烘箱干燥; D—本山, 硅胶干燥; E—黄旦, 硅胶干燥; F—铁观音, 硅胶干燥; G—本山, 真空冷冻干燥; H—黄旦, 真空冷冻干燥; I—铁观音, 真空冷冻干燥

图4 茶树嫩叶腹面微形态特征

态特征。

硅胶干燥法: 经过硅胶干燥处理后的茶树老叶, 在扫描电镜观察下, 3个品种的茶树叶片并没有发生严重的皱缩现象。茶树嫩叶经硅胶干燥处理后, 在扫描电镜观察下, 其叶表面发生严重的收缩, 叶片腹面褶皱严重, 其表面纹饰不能反映真实

的微形态特征。

真空冷冻干燥法: 3个品种的茶树叶片经过真空冷冻干燥处理后, 在扫描电镜观察下, 茶树老叶和嫩叶的原始形态均保存良好, 均可以反映真实的微形态特征。

表2 3种干燥方法对茶树叶片微形态的影响

叶片	品种	干燥方法	叶片是否发生收缩	气孔器是否变形	叶腹面纹饰特征
老叶	本山	烘箱干燥	否	否	平整, 表面有球形凸起
		硅胶干燥	否	否	平整, 表面有球形凸起
		真空冷冻干燥	否	否	平整, 表面有球形凸起
	黄旦	烘箱干燥	否	否	平整, 表面有不规则块状凸起
		硅胶干燥	否	否	较平整, 表面有不规则块状凸起
		真空冷冻干燥	否	否	平整, 表面有不规则块状凸起
	铁观音	烘箱干燥	否	否	平整, 表面有紧密不规则块状凸起
		硅胶干燥	否	否	平整, 表面有紧密不规则块状凸起
		真空冷冻干燥	否	否	平整, 表面有紧密不规则块状凸起
嫩叶	本山	烘箱干燥	是	否	波浪状皱脊
		硅胶干燥	是	是	紧密无规则条状皱脊
		真空冷冻干燥	否	否	平整, 表面有紧密块状凸起
	黄旦	烘箱干燥	是	是	网状皱脊
		硅胶干燥	是	是	网状皱脊
		真空冷冻干燥	否	否	网状脊纹, 表面有块状凸起
	铁观音	烘箱干燥	是	是	网状皱脊, 覆有脑状纹饰
		硅胶干燥	是	是	严重皱缩
		真空冷冻干燥	否	否	平整, 表面有颗粒状凸起

2.2 茶树叶表面气孔密度与变化

对3个品种的茶树老叶和嫩叶进行气孔密度统计及方差分析(表3), 在茶树老叶结果方面, 本山和铁观音2个品种的老叶经3种方法处理后, 其气孔密度差异不显著, 而黄旦经硅胶干燥法处理后气孔密度与烘箱干燥法和真空冷冻干燥法均差异显著; 在茶树嫩叶结果方面, 3个茶树品种经烘箱干燥法和硅胶干燥法处理后气孔密度均与真空冷冻干燥法差异显著, 其气孔密度较真空冷冻干燥法均产生了较大的增加, 其中本山嫩叶经烘箱干燥法处理后, 气孔密度达到了437.67个/mm², 较真空冷冻干燥法增加了53.75%。

2.3 综合分析

茶树叶片经3种不同干燥方法处理后, 茶树老叶和嫩叶呈现出不同变化: 茶树老叶经烘箱干燥法或真空冷冻法处理后, 其叶片未发生收缩现象, 表面纹饰和气孔密度均未受到影响, 能反映真实的微形态特征, 而经硅胶干燥法处理后, 虽然3个茶树品种的叶片微形态特征均在视野中保存较好, 但黄旦品种气孔密度异常, 因此硅胶干燥法并不适用于所有茶树品种老叶干燥处理; 茶树嫩叶经真空冷冻干燥法处理后, 叶表面未产生收缩现象, 其表面纹饰和气孔密度均未受到影响, 能反映真实的微形态特征, 而经烘箱干燥法或硅胶干燥法处理

表3 经3种干燥方法处理后的茶树叶片平均气孔密度及方差分析结果

叶片	干燥方法	平均气孔密度(个/mm ²)		
		本山	黄旦	铁观音
老叶	烘箱干燥	171.33 ± 11.78a	142.67 ± 7.17cb	271.00 ± 8.76a
	硅胶干燥	172.00 ± 10.33a	163.67 ± 17.25a	258.67 ± 30.96a
	冷冻干燥	167.33 ± 10.16a	148.33 ± 7.90b	272.00 ± 14.07a
嫩叶	烘箱干燥	437.67 ± 35.49a	337.33 ± 16.16b	406.67 ± 19.31a
	硅胶干燥	399.67 ± 32.98b	383.00 ± 14.35a	393.67 ± 22.80a
	真空冷冻干燥	284.67 ± 11.13c	273.00 ± 12.61c	267.67 ± 10.78b

注:同列数据后的不同小写字母表示不同处理方法差异显著($P < 0.05$)。

后,均发生严重的收缩现象,叶片表面纹饰和气孔密度均受到了不同程度的影响,不能反映真实的茶树叶片微形态特征,因此烘箱干燥法和硅胶干燥法并不适用于茶树嫩叶的干燥处理。

3 讨论与结论

本研究中3种茶树叶片扫描电镜样品制备干燥方法的原理各不相同:烘箱干燥法是利用热空气将热量传递给叶片,气化叶片中的水分,形成水蒸气,从而达到快速干燥的效果;硅胶干燥法是通过硅胶干燥剂内部的毛细孔网状结构吸收水分,并通过其物理吸引力将水分保留,从而使样品脱水干燥;真空冷冻干燥法是将叶片在较低的温度下冻结成固态,然后在真空条件下使其中的水分不经液态直接升华为气态,最终使叶片脱水。对茶树叶片进行干燥处理时,由于水具有较大的内聚力和电极性,可与样品中的极性成分瞬间结合,在挥发干燥时会牵动样品组分,如果叶片较嫩,含水量较高,有可能造成样品收缩变形或微小断裂。在茶树老叶扫描电镜制样过程中,由于其含水量少,角质层和上下表皮厚度较厚等特点,烘箱干燥法和真空冷冻干燥法均适合,但考虑到真空冷冻干燥法的操作复杂性及成本相对较高,在进行茶树老叶片的扫描电镜研究中,采用烘箱干燥法是简便、经济、快速的制样方法。在茶树嫩叶扫描电镜制样过程中,茶树嫩叶含水较多,角质层和上下表皮厚度较薄,采用烘箱干燥法或硅胶干燥法处理时容易发生变形收缩现象,影响观察结果,而真空冷冻干燥法是选用高熔点的有机溶剂——叔丁醇作升华介质,使水分从固态直接转化为气态,不经过液态阶段,因而避免了气相和液相之间表面张力对样品的损伤^[18]。

综上,在茶树品种叶片微形态学比较研究、茶树叶片发育过程研究等茶树叶片微形态学相关研究中,如果选用茶树老叶作为研究材料,建议采用更简便、经济、快速的烘箱干燥法进行样品制备;如果需要嫩叶的微形态特征进行观察,建议采用保留真实形态更佳的真空冷冻干燥法作为扫描电镜样品制备的优选方法。

参考文献:

- [1] Guan H Y, Han Z W, Cao H N, et al. Characterization of multi-scale morphology and superhydrophobicity of water bamboo leaves and biomimetic polydimethylsiloxane (PDMS) replicas [J]. Journal of Bionic Engineering, 2015, 12(4): 624-633.
- [2] Lu L, Wang H, Blackmore S, et al. Pollen morphology of the tribe Rhinanthae (Orobanchaceae) and its systematic significances [J]. Plant Systematics and Evolution, 2007, 268(1/2/3/4): 177-198.
- [3] Ortúñez E, de la Fuente V. Epidermal micromorphology of the genus *Festuca* L. (Poaceae) in the Iberian Peninsula [J]. Plant Systematics and Evolution, 2010, 284(3/4): 201-218.
- [4] Yu W T, Jacques F M, Chen S T, et al. Nutlet micro-morphology of the genus *Microula* (Boraginaceae) from the Qinghai-Tibetan Plateau, and its systematic implications [J]. Nordic Journal of Botany, 2012, 30(5): 596-612.
- [5] 徐柏森, 杨静. 实用电镜技术 [M]. 南京: 东南大学出版社, 2008: 93-96.
- [6] 曹君迈, 贝盏临, 江涌, 等. 枸杞花蕾扫描电镜制样方法的探讨 [J]. 北方园艺, 2010(3): 30-32.
- [7] 郭素枝. 扫描电镜技术及其应用 [M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2006: 74-84.
- [8] 侯燕鸣, 胡剑江, 方蕾, 等. 扫描电镜的不同含水量植物叶片样品的处理及观察方法研究 [J]. 分析仪器, 2011(5): 45-48.
- [9] Yuparat P, Singhanat P, William L K. The effects of pre-drying treatments and different drying methods on phytochemical compound retention and drying characteristics of moringa leaves (*Moringa oleifera* Lam.) [J]. Drying Technology, 2014, 32(16): 1970-1985.
- [10] 苟占平, 万德光. 电镜扫描叶片鉴定川渝商品金银花的植物来源 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(10): 2507-2508.
- [11] 石婕, 刘庆倩, 安海龙, 等. 不同污染程度下毛白杨叶表面PM_{2.5}颗粒的数量及性质和叶片气孔形态的比较研究 [J]. 生态学报, 2015, 35(22): 7522-7530.
- [12] Farraant J M, Lehner A, Cooper K, et al. Desiccation tolerance in the vegetative tissues of the fern *Mohria caffrorum* is seasonally regulated [J]. The Plant Journal, 2009, 57(1): 65-79.
- [13] 戴叶辉, 王琳, 邢福武, 等. 13种榕属植物的叶片结构及其对环境的适应性 [J]. 仲恺农业工程学院学报, 2012, 25(4): 5-13.
- [14] 张艳霞, 朱必娟, 肖德兴. 印度橡皮榕与紫叶橡皮榕叶片的解剖结构 [J]. 仲恺农业工程学院学报, 2010, 23(3): 31-35.
- [15] Antal T, Chong C H, Law C L, et al. Effects of freeze drying on retention of essential oils, changes in glandular trichomes of lemon balm leaves [J]. International Food Research Journal, 2014, 21(1): 387-394.
- [16] Pathan A K, Bond J, Gaskin R E. Sample preparation for SEM of plant surfaces [J]. Materials Today, 2010, 12(1): 32-43.
- [17] 黄晓敏. 闽南茶区不同乌龙茶品种叶片显微结构比较研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2010.
- [18] 肖媛, 刘伟, 汪艳, 等. 生物样品的扫描电镜制样干燥方法 [J]. 实验室研究与探索, 2013, 32(5): 45-53.