

# 枸杞花蕾扫描电镜制样方法的探讨

曹君迈, 贝盏临, 江涌, 魏杰, 许鑫

(北方民族大学 生物科学与工程学院, 宁夏 银川 750021)

**摘要:**以枸杞花蕾为材料,经常规石蜡切片及脱蜡技术,采用4种干燥法处理样品,再经电镜、扫描电镜观察拍照,通过图片分析比较,从而获得一种适合植物花蕾扫描电镜制样的干燥方法。结果表明:叔丁醇结合真空冷冻干燥仪干燥处理植物花蕾效果更佳,通过此法,获得的图像清晰,细胞及其组织的三维结构可被完好地保存

**关键词:**扫描电镜;干燥法;枸杞;花蕾

**中图分类号:**Q 944-3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)03-0030-03

扫描电子显微镜是1965年发明的较为现代的研究工具之一。随着电子显微镜技术的普及和发展,扫描电镜已广泛应用于形态学的观察和研究中。利用扫描电镜技术对动物材料研究报道较多,并建立了一定的研究方法,如:郭素枝、张玲等采用叔丁醇干燥法<sup>[1-2]</sup>,黄立、陈敏忠等采用微波干燥法<sup>[3-4]</sup>,侯燕平采用乙腈干燥法<sup>[5]</sup>,Inoue等以叔丁醇作置换剂的冷冻干燥法<sup>[6]</sup>都达到预期的效果。对植物材料的研究多数以花粉形态、叶片的表面结构观察为主<sup>[7-11]</sup>,只有高德禄等<sup>[12]</sup>对单层细胞材料洋葱,采用叔丁醇干燥法获得满意。而扫描电镜技术结合石蜡切片技术,研究植物花蕾的制样技术未见文献报道。生物样品的制备过程中脱水与干燥处理,是电镜标本制作过程中的关键环节,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,因此,选择一种适宜的干燥方法尤为重要。因此现以枸杞新鲜花蕾为试材,重点研究样品的干燥方法,从中筛选出最优的干燥方法,从而为寻求适用于植物不同花药发育时期花蕾扫描电镜制样方法,特别是花药中花粉粒发育亚显微结构的观察提供了有效的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

宁夏枸杞新鲜花蕾均采于银川市西夏区育新枸杞种业有限公司枸杞种植园。

### 1.2 试验设备

Leica RM2235 切片机、SSX-550 日本岛津扫描电镜、KBC12 型离子溅射仪、ALPHA 真空冷冻干燥仪、格

兰仕微波炉。

### 1.3 试验方法

将制备好的石蜡切片经在二甲苯中停留 15 min 溶去石蜡,然后将切片分别置于二甲苯与纯酒精各半混合液和纯酒精中各 0.5 h,按微波干燥处理样品:分别取脱蜡切片 3 组,编号 W20 s, W30 s, W40 s(W-微波处理),然后将切片放入微波炉中,分别处理 20、30、40 s。液氮干燥处理样品:分别取脱蜡切片 3 组,编号 Y20 s, Y30 s, Y40 s(Y-液氮处理),放入研钵,将液氮倒入研钵中浸没样品,分别处理 20、30、40 s。真空冷冻干燥仪干燥处理样品:分别取脱蜡切片放入 ALPHA 真空冷冻干燥仪中,在低真空状态下使样品干燥 24、36 h。叔丁醇结合真空冷冻干燥仪干燥处理样品:取脱蜡切片放入纯叔丁醇 3 次,每次 10 min,最后 1 次叔丁醇置 4℃ 冰箱内,至样品完全凝固后取出,放入 ALPHA 真空冷冻干燥仪中,在低真空状态下使样品分别干燥 18、24 h。然后取出样品,均放入干燥器中,将干燥处理好的样品分别取出,用导电胶将样品粘附在样品台上,并记好样品材料位置,送入 SBC-12 小型离子溅射仪内,在 4 Pa 的真空度,8 mA 的电流下,进行 90 S 的镀金处理。将喷镀好的样品粘台置于 SSX-550 型日本岛津产扫描电镜下观察、拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 微波干燥处理结果

不同时间微波干燥处理扫描电镜的制样效果不同,所有处理图片导电性较好。微波 20 s 处理(图 1),细胞较为平整、结构完整清晰;微波 30 s 处理(图 2),细胞有突起现象,结构微皱缩;微波 40 s 处理(图 3),细胞出现突起,结构皱缩;由此说明,微波干燥处理较为适宜时间为 20 s,在没有其它设备的条件下,可选用 20 s 处理方法。

### 2.2 液氮干燥处理结果

不同时间液氮干燥处理扫描电镜的制样效果不同,所有处理图片导电性差。液氮 20 s 处理(图 4),细胞结

**第一作者简介:**曹君迈(1964-),女,宁夏银川人,教授,硕士生导师,研究方向为药用植物资源开发与利用,主持国家级课题 1 项,省部级课题 1 项,参加国家级课题 2 项,发表论文 30 余篇。

**基金项目:**宁夏自治区自然科学基金资助项目(Nz0835)。

**收稿日期:**2009-11-25

构变形;液氮 30 s 处理(图 5),细胞结构较为平整且清晰;液氮 40 s 处理(图 6),细胞结构较完整,不清晰。此方法处理样品时间不宜控制,所有处理效果不佳,不利于结果观察。

### 2.3 真空冷冻干燥仪处理结果

采用真空冷冻干燥处理样品,无论是 24 h 还是 36 h,样品细胞结构均不完整,导电性较差(图 7、8),此法不适宜植物花蕾制样。

### 2.4 叔丁醇结合真空冷冻干燥仪干燥处理结果

不同时间叔丁醇结合真空冷冻干燥处理扫描电镜的制样效果不同,24 h 处理较 18 h 导电性差(图 9、10)。用 18 h 真空冷冻干燥法制样,不同放大倍数的样品细胞结构清晰、平整,导电性好(图 9、10、11)。图 11 花粉粒饱满,而图 12 花粉粒不饱满(为不育材料的花粉粒),其三维结构清晰可辨,因此,选 18 h 干燥方法制备扫描电镜样品是一种适宜花蕾制样的干燥方法。

## 3 讨论

枸杞新鲜花蕾含水量高,要想获得清晰度好、分辨率高、衬度适中的图像和照片,在样品制备过程中,脱水、干燥尤为重要,处理时间要适度,否则样品的导电性差,甚至表面结构改变,导致观察结果出现误差,影响试验的准确性和可靠性。将干燥好的样品用导电胶将观察面朝上粘台,送入 SBC-12 小型离子溅射仪内进行镀金处理,如果处理时间不足,导电性差,处理时间过长,结构不清,因此,要选择适宜的处理时间。

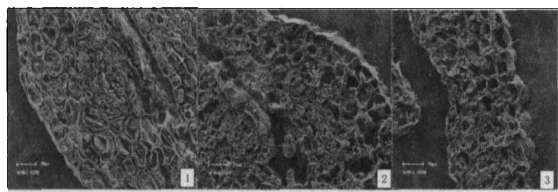


图 1 不同时间微波干燥处理电镜制样图

注:① 20 s 处理;② 30 s 处理;③ 40 s 处理。

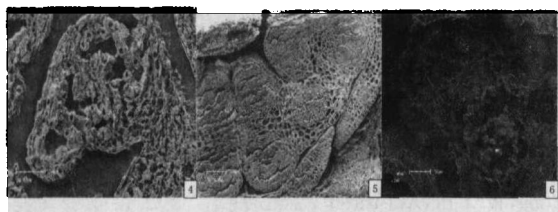


图 2 不同时间液氮干燥处理扫描电镜

注:④ 20 s 处理;⑤ 30 s 处理;⑥ 40 s 处理。

根据郭素枝<sup>[1]</sup>,张玲<sup>[2]</sup>,王响英<sup>[13]</sup>试验,认为叔丁醇不仅对动物样品结构具有保护作用,而且在该试验中发现对植物样品结构仍有保护作用,因此叔丁醇结合其他干燥法,可适合于生物样品的制样。

石蜡切片技术结合叔丁醇真空冷冻干燥仪干燥法处理样品,可清晰的观察花粉发育情况,为判定雄性不

育性提供了可靠的方法。

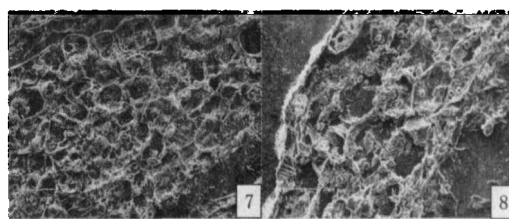


图 3 真空冷冻干燥仪处理扫描电镜制样图

注:⑦ 24 h 处理;⑧ 36 h 处理。

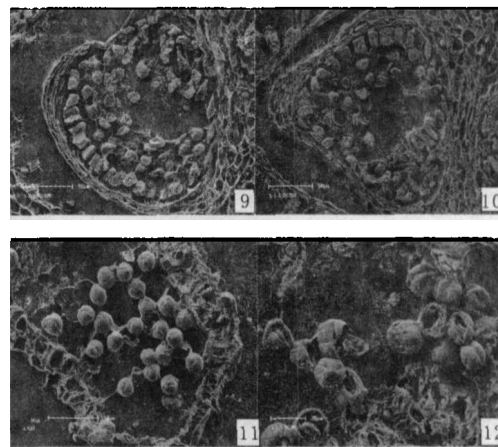


图 4 叔丁醇结合真空冷冻干燥仪处理扫描电镜制样图

注:⑨ 24 h 处理;⑩⑪⑫均为 18 h 处理。

## 4 结论

叔丁醇结合真空冷冻干燥仪干燥处理植物花蕾效果优于微波干燥、液氮干燥和真空冷冻干燥。

### 参考文献

- [1] 郭素枝,季清娥.昆虫扫描电镜样品干燥法[J].福建农业大学学报,2001,30(2):262-265.
- [2] 张玲,李令,王嘉伦.扫描电镜生物标本的一种新干燥方法—叔丁醇冻干法[J].沈阳医学院学报,1997,11(4):40-41.
- [3] 黄立,王玲.扫描电镜生物标本制备的超快微处理技术[J].电子显微学报,1993,12(1):87.
- [4] 陈敏忠,甘习华,徐柏生.微波辐射扫描电镜生物样品制备技术的研究[J].电子显微学报,1994,13(1):66.
- [5] 侯燕平,牛吉山,杨煜升.血细胞扫描电镜样品制备方法的探索[J].电子显微学报,1996,15(5):432.
- [6] Inoue T, Qsatake H. A new drying method of biological specimens for scanning elemicroscopy: The b-tubyl I alcohol freeze-drying method[J]. Arch Histol Cytol, 1988, 51(1):53-59.
- [7] 徐迎碧,丁之恩,巩如英,等.4个石榴品种叶表皮特征电镜扫描分析[J].安徽农业科学,2008,36(27):11709-11711.
- [8] 俞斐,李树美,沈显生.长梗苦草雄花结构的环境扫描电镜观察[J].西北植物学报,2007,27(5):0859-0863.
- [9] 许玉凤,张轲,王文元,等.9种鸢尾植物花粉形态的扫描电镜观察[J].沈阳农业大学学报,2008,39(6):733-736.
- [10] 蔡刘体,蒋光华,郑少清,等.烟草叶片表面腺毛形态的扫描电镜观察[J].农业科学技术,2008,24(8):110-113.

# 苍葱种子繁殖特性及不同处理对种子发芽的影响

张忠宝<sup>1</sup>, 刘丽艳<sup>2</sup>, 黄城秀<sup>1</sup>, 赖建平<sup>1</sup>

(1. 吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132021; 2. 吉林省东丰县拉拉河镇农业站, 吉林 东风 132021)

**摘要:**阐述了苍葱种子的繁殖特性。人工移栽6a后的植物每墩可采种子约943粒。无论秋播或春播,种子均要经过1个夏季才能生出胚根,并等到越冬后的次年春天出苗。种子不经低温层积处理可以发芽,但低温层积30~45d会显著提高发芽率(达88.3%)。用不同浓度的6-苄氨基嘌呤(6-BA)、赤霉素(GA<sub>3</sub>)、萘乙酸(NAA)处理种子,测定种子的发芽率。结果表明:直接以GA<sub>3</sub>100~150 mg·L<sup>-1</sup>及NAA 5 mg·L<sup>-1</sup>浸种24h,发芽率达到了90%以上。

**关键词:**苍葱;种子繁殖;实生繁殖;层积;发芽

**中图分类号:**S 633.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)03-0032-03

苍葱(*Allium victorialis* L.)为百合科(Liliaceae)葱属多年生草本植物。别名格葱、山葱、隔葱、鹿耳葱。在吉林省也被称为寒葱。为药食兼用植物。苍葱的茎叶均可食用。在清代曾做为贡品为皇族所用。苍葱粗蛋白含量14.0 g·kg<sup>-1</sup>,粗脂肪9.0 g·kg<sup>-1</sup>,V<sub>C</sub> 2.5 g·kg<sup>-1</sup>,其中,鲜叶V<sub>C</sub>含量最高,可达3.0 g·kg<sup>-1</sup>。在药用上,性微温、味辛、无毒。归肺经,具辛散温通,芳香辟秽,用于风寒感冒,呕恶胀满之症。从苍葱中提取的二硫化物和三硫化物对降低胆固醇、降血脂和预防癌症、预防血栓、动脉硬化、脑梗塞有良好的效果。

**第一作者简介:**张忠宝(1963-),男,副教授,现主要从事蔬菜果树栽培及育种工作。E-mail: jlzxb007@yahoo.com.cn。

**基金项目:**吉林省教育厅资助项目。

**收稿日期:**2009-11-06

苍葱在国内多个省份有分布,但数量均少,分布稀疏。在东北,苍葱分布在长白山脉海拔500~1 000 m阴坡山林中。目前在吉林省敦化、长白、安图及辽源地区发现有少量分布。

目前尚无人工大面积栽培,少量栽培均为由野生苍葱植株采挖移栽的小块地,在实生繁殖方面没有相关资料记载。但课题组调查发现,野生植株成群块分布;人工移栽田成龄株开花并结籽,并且在植株下面有幼苗生长。因此断定可以进行种子繁殖。

## 1 材料与方法

### 1.1 种子千粒重测定及采种量调查

种子采集:2006~2008年秋采集野生及移栽苍葱植株所产种子。在吉林省,种子于9月份成熟,待花茎及蒴果变黄、种子变黑时清晨采收蒴果,晾干、脱粒。自然阴干后贮于通风干燥处。

[11] 李建军,李景原,朱命伟,等. 3种芦荟属植物叶的表皮扫描电镜观察及芦荟素含量的测定[J]. 西北植物学报,2004,24(8):1397-1401.

[12] 高德禄,张和民,苏秀珍. 一种制备植物扫描电镜样品的新干燥法—

叔丁醇冻结干燥法[J]. 植物学报,1989,31(9):770-774.

[13] 王响英,吴淑燕,李苏安,等. 叔丁醇脱水干燥法在游离细胞扫描电镜样品制备中的应用[J]. 苏州大学学报(医学版),2005,25(5):834-835.

## Flower Bud of *Lycium barbarum*, L Scanning Electron Microscopy Sample Preparation Methods Discussde

CAO Jun-mai, BEI Zhan-lin, JIANG Yong, WEI Jie, XU Xin

(College of Biological Science and Engineering, North University of Ethnicity, Yinchuan, Ningxia 750021)

**Abstract:** The flower bud of *Lycium barbarum*, L is made from paraffin embed section, by dewax and four drying method deal with specimens, and then photographed by scanning electron microscopy, image analysis, through comparison, to obtain one of the most suitable scanning electron microscopy of plant buds kind of drying system. The results showed that the combination of tert-butyl alcohol vacuum with freeze-drying instrument drying method was fit for the plant flower, cells in the tissue cells of the three-dimensional structure can be well-preserved, gotten clear images by the method.

**Key words:** scanning electron microscopy; drying methods; *Lycium barbarum*; flower bud