

青岛老鸛草花粉和花芽扫描电镜制样条件探讨

胡春辉,卢婉佩,刘鹏起,刘庆华,袁玉清

(青岛农业大学 中心实验室,山东 青岛 266109)

摘要:为了探究与老鸛草相关类型花粉花芽的样品电镜制备,采用直接观察法和戊二醛固定冷冻干燥法对青岛老鸛草花粉扫描电镜制样条件进行了研究。结果表明:直接观察法制备的青岛老鸛草花粉颗粒在扫描电镜下形态饱满,结构清晰,花粉表面的纹饰和突起微观结构清晰完整;改进的 FAA 单固定冷冻干燥法处理的青岛老鸛草花芽形态学结构完整,层次丰富,立体感强,细胞失水皱缩得到明显改善。通过对不同制样方法进行比较,最终得到可靠简单易行的样品制备方法,对牻牛儿苗科植物的研究及相关类型花粉花芽的样品制备有重要的指导意义。

关键词:冷场发射扫描电镜;青岛老鸛草;花粉;花芽;样品制备

中图分类号:Q-336

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2013)12-0082-03

青岛老鸛草(*Geranium tsingtauense* Yabe.) 属于牻牛儿苗科(Geraniaceae)老鸛草属(*Geranium*)植物,仅在山东青岛崂山及附近山地有分布,主要生于林缘或阴坡草丛中^[1]。因其外型美观、花朵繁茂、花果期长,适宜作为园林绿化植物,具有极高的观赏价值和巨大的园林应用潜力。但是青岛老鸛草自然分布区域狭窄,生存环境受到严重破坏,导致其资源锐减濒临灭绝,已被列为国家第二批珍稀濒危植物^[2]。

植物花粉有许多细微的形态特征体现出种间差异,其形状稳定,用扫描电镜观察植物花粉表面的微形态特征,在遗传学和分类学研究中具有重要的科学价值^[3]。花芽分化早期形态发育及其细胞超微结构对于研究其分化过程有重要意义。而扫描电镜观察到的这类特征是否真实和清晰,在很大程度上取决于样品的制备。经过对比分析,有针对性地对青岛老鸛草花粉和花芽的扫描电镜样品制备方法进行了探索^[4-8],旨在寻找一种较理想的花粉花芽样品制备方法,一方面为相关类型的花粉花芽样品扫描电镜制备提供参考,另一方面为研究老鸛草属植物的系统演化、资源保护及引种驯化提供依据。目前对该物种的研究局限在化

学成分和药用方面^[9-11],关于其花粉颗粒特征和花芽微观结构等方面的研究鲜见报道,因此该方法的探索具有重要的指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料

试验中用到的青岛老鸛草花粉和花芽均取自青岛农业大学园林园艺学院种质资源室与苗圃地。

主要仪器有日本电子冷场发射扫描电镜 JSF-7500、日本电子 JFD-320 冷冻干燥机和日本电子 JFC-1600 型离子溅射仪。

1.2 方法

1.2.1 花粉粒的扫描电镜制样方法 已开花的花药表面可能会污染杂质,影响表面细微结构的观察,因此采用含苞待放的花蕾,以确保花粉的表面无杂质污染。首先将花药外壳剥离,将花粉粒分成 2 份,一份用直接观察法处理:花粉粒自然干燥后不进行其它预处理,直接粘在导电胶上,喷金后上机观察;另一份用戊二醛固定冷冻干燥法处理:将花粉粒置于 70%乙醇中,50 W 33 kHz 超声清洗 5 min,重复清洗步骤 1~2 次;用 30%乙醇多次换洗前处理液,每次 5 min,直至换洗液加入后花粉粒随溶液翻动而散开,无积聚,溶液澄清为止;用 2.5%的戊二醛固定 4~5 h;PBS 缓冲液清洗 2 次;然后依次用 30%,50%,70%,85%,95%和 100%的乙醇溶液置换,每次 15~20 min,其中 100%乙醇置换 2 次;用 1:1 的乙醇:叔丁醇溶液置换 30 min,再用 100%叔丁醇置换 2 次,每次 30 min;将含有花粉粒的溶液直接滴到样品台上自然风干。喷金后,上机观察即可,花粉颗粒的

收稿日期:2013-08-23

基金项目:青岛农业大学实验技术研究资助项目(SYJK12-03)

第一作者简介:胡春辉(1987-),女,山东省潍坊市人,硕士,助理实验师,从事扫描电镜的使用和维护方面的研究。E-mail:hollyhuchunhui@gmail.com。

通讯作者:袁玉清(1965-),男,山东省荣成市人,学士,高级实验师,从事仪器分析方面的研究。E-mail:sbk@qau.edu.cn。

喷金条件为电流 20 mA,喷金时间为 90 s。

1.2.2 花芽的扫描电镜制样方法 将花芽从植株上剥离后立即放入 FAA 固定液(福尔马林-醋酸-酒精混合液)中保存备用。试验时取野外 FAA 固定液中浸泡保存的新鲜花芽,在体视镜下用解剖针仔细剥离出完整的花芽。

将花芽分别进行处理:

方法 1:FAA 单固定冷冻干燥法。花芽在 FAA 固定液中固定后,依次用 30%,50%,70%,85%,95% 和 100% 乙醇溶液置换,每次 15~20 min,其中 100%乙醇置换 2 次;用 1:1 的乙醇:叔丁醇置换 30 min,再用 100%叔丁醇置换 2 次,每次 30 min;将置换后的花芽置于 4℃ 冰箱中预冷,然后放入冷冻干燥机中进行干燥。

方法 2:FAA 和戊二醛双固定冷冻干燥法。花芽经 FAA 固定后,用 2.5% 戊二醛进行后固

定,叔丁醇置换后,冷冻干燥(脱水干燥步骤同方法一)。

方法 3:改进后的 FAA 单固定冷冻干燥法。固定脱水方法同方法 1。冷冻干燥过程中保持 5℃ 的低温,并在培养皿外包 2 层或 6 层保鲜膜以消除表面张力,防止抽气速度过快,使细胞失水太快,导致组织塌陷成细胞皱缩。花芽的喷金条件为电流 20 mA,喷金时间为 180 s。

2 结果与分析

2.1 花粉颗粒形态

戊二醛固定冷冻干燥法处理的花粉颗粒外观形态较为完整,但是表面覆盖了一层杂质,无法看清其表面的纹饰和细微结构。颗粒表面的突起无法判定是杂质还是花粉颗粒固有的特征(见图 1A、B、C)。

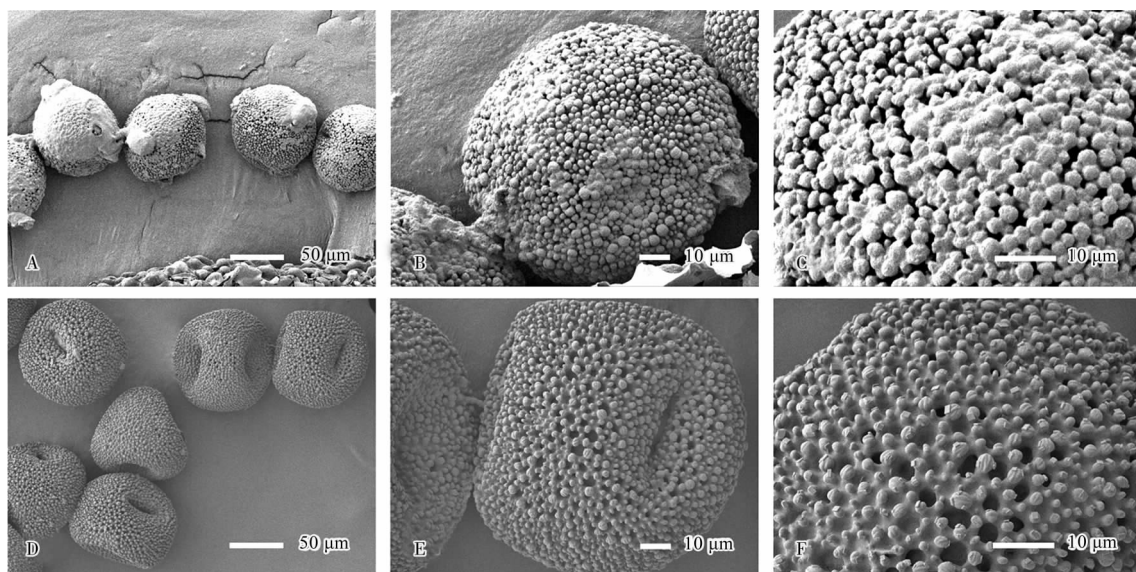


图 1 不同处理方法下青岛老鹳草花粉颗粒形态

A、B、C 为戊二醛固定冷冻干燥法处理的花粉形态;D、E、F 为直接观察法处理的花粉形态

Fig. 1 Pollen structure of *Geranium tsingtauense* Yabe. under SEM by different methods

A, B, C: Pollen of *Geranium tsingtauense* Yabe. by glutaraldehyde restituting; D, E, F: Pollen of *Geranium tsingtauense* Yabe. by direct observation

直接观察法处理的花粉颗粒在高分辨的扫描电镜中外观形态基本保持良好,形态完整饱满,表面整洁,变形与破碎少,纹饰和突起清晰可见(图 1D、E、F)。从图 1 中可以十分清晰的看出老鹳草花粉粒雕文凹凸不平,每个花粉粒上有两个沟槽。有的花粉颗粒表面突起上附有形状规则的晶体(见图 2)。

结果表明,直接观察法处理青岛老鹳草花粉颗粒,制样方法简单,操作方便,不但能保持花粉

的活体形态,还可提供丰富的花粉生存信息和微观结构,是一种理想的扫描电镜制备方法。

2.2 花芽的形态结构

FAA 单固定冷冻干燥法处理的青岛老鹳草花芽,样品组织结构遭到破坏,细胞失水塌陷,样品导电性较差,用扫描电镜拍出的照片效果不佳(见图 3A、B)。

FAA 和戊二醛双固定冷冻干燥法处理的青岛老鹳草花芽电镜扫描结果表明,戊二醛后固定

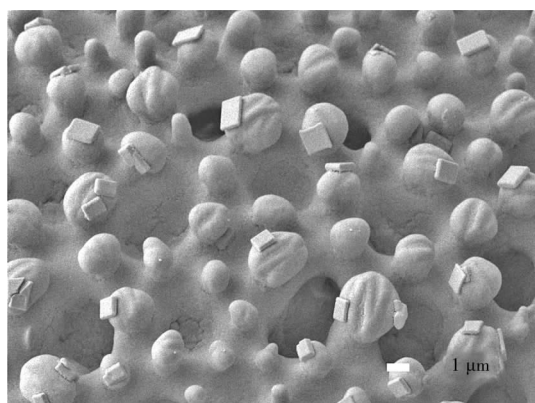


图2 青岛老鹳草花粉表面形态
Fig. 2 Pollen surface structure of
Geranium tsingtauense Yabe.

没有明显改善方法1中存在的问题(见图3C、D)。

改进后的FAA单固定冷冻干燥法处理青岛老鹳草花芽,扫描电镜图片显示:花芽的组织结构完整,立体感强,细胞失水的状况得到明显改善。说明影响花芽扫描电镜观察的关键步骤是脱水,降低脱水过程的温度和减慢抽气速度能明显改善试验结果。为了减缓降压速度,分别采用不同层

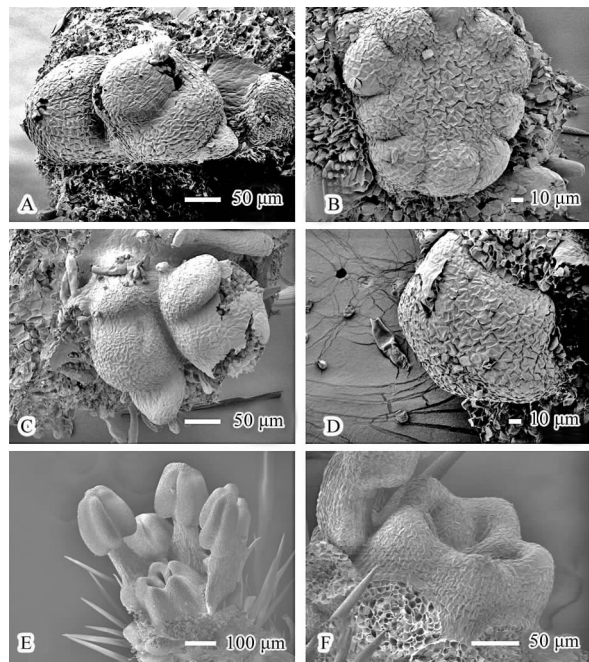


图3 青岛老鹳草花芽的微观结构
A、B:方法1处理的老鹳草花芽;C、D:方法2处理的老鹳草花芽;E、F:方法3处理的老鹳草花芽

Fig. 3 The micro-structure of bud in
Geranium tsingtauense Yabe.

A、B:FAA fixation treatment;C、D:FAA and glutaric aldehyde double fixed treatment;E、F:FAA single fixation improved freeze drying treatment

数(2层或6层)保鲜膜包裹花芽、不同抽气温度(常温或5℃)和脱水时间(10或30 min)组合进行试验,其中包被2层保鲜膜,脱水全过程温度控制在5℃,脱水时间控制在10 min左右的处理效果要优于其它条件组合,这表明在减少样品表面压力的条件下,应尽量缩短制样时间(见图3E、F)。

3 结论与讨论

青岛老鹳草的花粉壁厚、含水量少,自然风干后可直接粘到样品台上,离子溅射仪喷镀后上机观察。直接观察法处理的花粉粒能够较好地保持样品的原始状态^[12],花粉表面的细微结构清晰可见,并观察到花粉表面分布有形状规则的晶体。样品制备方法简单易行,周期短,成本低廉。为该类型花粉的研究提供了实验依据和微形态资料。

新鲜花芽的含水量高,要想获得形态完整、清晰度高、分辨率高、衬度适中的图片,在样品制备过程中,脱水干燥方法十分重要,尽量减少表面张力的影响;固定液的选择也十分重要^[13],已报道的文献中通常采用戊二醛和锇酸双固定法对样品进行固定,用临界点干燥法对样品进行脱水。但是锇酸为剧毒物质,使用时污染环境并且危害操作者的身体健康,临界点干燥仪操作较为繁琐,影响试验效率。该研究采用FAA固定液取代戊二醛-锇酸双固定,用冷冻干燥机代替临界点干燥仪,通过探索得到较为满意的图片,为以后的研究提供一种安全可行的方法。在处理过程中,脱水过程要保持低温缓慢,防止脱水过快导致细胞皱缩,组织塌陷,处理时间要适度,否则样品脱水导致表面结构发生改变,观察结果出现误差,影响实验数据的准确性和可靠性。

植物样品的扫描电镜制样方法需要根据样品的特性来制定,既要缩短时间节约成本,又要尽量保持样品的组织形态完整和细微结构清晰,以满足研究的需要。

参考文献:

- [1] 曾建飞,姚坚毅.中国植物志[M].北京:科学出版社,1998:76-77.
- [2] 臧得奎,樊金会,赵兰勇,等.山东省特有植物的研究[J].植物研究,1994,14(1):48-58.
- [3] 徐柏森,杨静.植物花粉扫描电镜技术与观察[J].西南林学院学报,2007,27(5):21-24.
- [4] 闭志强,蔡炳华,梁世春.几种扫描电子显微镜植物样品的制备技术[J].电子显微学报,2002,21(2):213-214.
- [5] 李和帅,范海阔.不同方法处理对椰子花粉扫描电镜观察结果[J].江西农业学报,2011,23(5):74-75.