

## 利用原子力显微镜观察芥蓝叶片气孔

陈少雄<sup>1</sup>, 陈家楠<sup>2</sup>, 蔡继业<sup>2</sup>

(1. 揭阳职业技术学院 生物系, 广东 揭阳 522000; 2. 暨南大学 化学系, 广东 广州 510632)

**摘要:** 利用原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)的振荡模式研究芥蓝叶片上表皮气孔的三维形貌, 并对气孔在叶片失水过程中的形态变化进行动态观察。结果表明, 通过 AFM 的扫描成像, 观察到芥蓝叶片表皮的气孔及其周围的细胞, 包括保卫细胞、副卫细胞、其他表皮细胞等的微观结构, 还观测到覆盖在副卫细胞的微纤维, 测量出这些微纤维的直径约为 400 nm, 间隔约为 200 nm。

**关键词:** 芥蓝叶片气孔; 原子力显微镜; 形态学

中图分类号: Q24 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)01-0009-03

### Morphological observation on stomata of cabbage mustard by atomic force microscope

CHEN Shao-xiong<sup>1</sup>, CHEN Jia-nan<sup>2</sup>, CAI Ji-ye<sup>2</sup>

(1. Department of Biology, Jieyang Vocational and Technical College, Jieyang, Guangdong 522000, China; 2. Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** The three-dimensional morphology was studied and the dynamic morphological changes in the process of losing water of stomata on the leaf of cabbage mustard were observed by using the tapping mode of atomic force microscope (AFM). The results showed that stomata and the other surrounding cells, including guard cells, subsidiary cells, and epidermal cells, could be clearly imaged by AFM. Furthermore, the micro fibers was found covering the subsidiary cells with diameter of about 400 nm with interval about 200 nm.

**Key words:** cabbage mustard stoma; atomic force microscope; morphology

高等植物叶片气孔的形态、数量以及分布与植物的生理功能关系密切<sup>[1]</sup>, 不同种类的植物, 气孔的形貌各不相同, 可以将气孔作为鉴别植物种类参数之一, 张菊平等<sup>[2]</sup>发现可以利用气孔保卫细胞的周长来鉴定辣椒植株是否属于单倍体或是二倍体。

目前, 观察叶片气孔形貌的仪器主要有光学显微镜<sup>[3-4]</sup>、扫描电镜<sup>[5-6]</sup>、共聚焦显微镜<sup>[7-8]</sup>等。用普通光学显微镜观察气孔是最常用的方法, 观察气孔的数量和分布简单易行, 但是受光学衍射极限的限制, 极限分辨率只能达 300 nm 左右, 无法看清气

孔表面的细节。利用扫描电镜可以清晰地看到气孔的形貌, 但是样品制作过程复杂且必须在真空中成像, 而气孔被观察时已经处于失活状态, 既无法观察气孔的动态过程, 图像也会有一定程度的失真。

原子力显微镜 AFM 观察植物叶片气孔, 制样简单, 分辨率可以达到 10 nm, 远高于环境扫描电子显微镜(ESEM)。可直接将样品黏附于云母、石墨、玻片等平整的基底表面进行扫描, 还可以在近生理状态下对样品进行成像。由于 AFM 的这些独特优势, 已有很多研究应用它来探讨各种生物过程, 但是目前尚未见到直接利用活体材料通过 AFM 观察

收稿日期: 2009-08-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30872404)

作者简介: 陈少雄(1953—), 男, 广东揭阳人, 高级农艺师, 从事植物学研究

叶片气孔超微结构的报道。笔者采用 AFM 振荡模式<sup>[9-10]</sup>研究芥蓝叶片气孔表面及其周围的超微结构，并对气孔在温度升高过程中的形态变化进行动态观察。

AFM 是利用光杠杆原理产生的光束偏转技术研制而成的<sup>[9]</sup>。在一个对形变极为敏感的微悬臂(cantilever)的一端安装纳米级的针尖，扫描时样品和针尖存在力的相互作用，使微悬臂产生形变，导致从针尖背面反射到四象限检测器的激光束发生微弱变化，继而产生电压差，最后将这些电压信号转换为图像。用于分析的模式有接触模式(contact mode)和振荡模式(tapping mode)两种。使用接触模式进行扫描时，针尖与样品相互接触，所成图像具有较高的分辨率，通常用来检测样品的物理属性，由于剪切力的存在，对样品有一定损伤，很少用于探测生物样品。振荡模式是靠声学或磁力驱动，针尖和样品只有短暂接触，作用力较小，常用于生物样品成像<sup>[10]</sup>。

### 1 材料与方 法

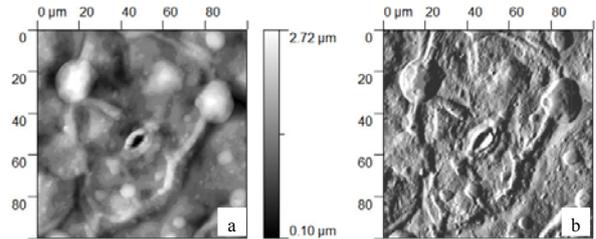
选取新鲜芥蓝叶片，上表皮朝上，用无菌蒸馏水冲洗两遍后，切成 2 cm×2 cm 的小方块，通过双面胶将小方块固定于盖玻片上，将盖玻片放置于 AFM 的样品台上留待观察。

将盖玻片置于 AFM(Cpresearch, Thermomicroscopes, USA) 样品台上，利用监视器将探针定位在叶片上任意平坦区域。样品在 Tapping 模式下观察，悬臂针尖曲率半径为 10 nm，力常数约为 2.8 N/m，室温下观察，扫描速率 1 Hz。AFM 图像仅经过平滑处理(Thermomicroscopes, Proscan Image Processing Software Version 2.11 软件)，利用软件的线分析功能，对图像进行剖面高度曲线的分析。

### 2 结 果

用 AFM 对样品进行大范围的扫描，得到图 1-a 所示扫描范围为 100 μm×100 μm 的高度图，高度图以灰度值的高低表示物体高度的变化，灰度值越高(越接近白色)表示高度越高，灰度值越低(越接近黑色)表示高度越低，图片正中间是一个张开的气孔，

气孔的周围分布着圆形或长条形的表皮细胞。图 1-b 是同一位置的振幅图，振幅图比高度图更形象地反映出物体的形态特征。

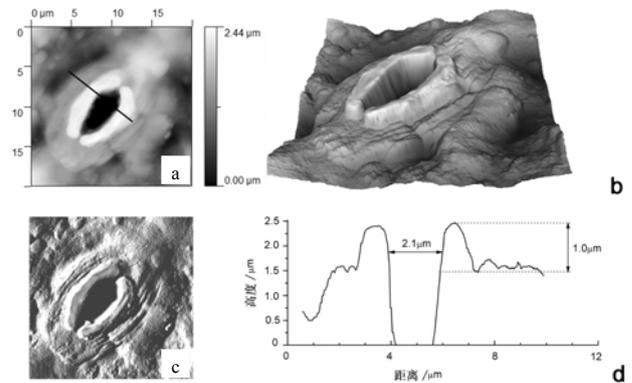


a 高度图；b 振幅图。

图 1 芥蓝叶片表皮的 AFM 图像

Fig.1 The AFM image of epidermis of cabbage mustard, scanning area

对样品进行进一步的局部扫描可以得到气孔的放大图(图 2-a、图 2-c)，通过放大，得到气孔的形貌特征，可以清楚地分辨气孔由左右两个半月形的保卫细胞组成，环绕着保卫细胞的是两个副卫细胞，这种气孔构成方式为平轴式。图 2-b 是三维图，三维图可以从各个角度观察物体，可以得到更形象的结果。图 2-d 是图 2-a 中黑色剖面线所示的气孔高度曲线图，从曲线图中可以得到气孔张开处的最大距离为 2.1 μm，保卫细胞的高度约为 1 μm。



a 高度图；b 三维图；c 振幅图；d a 图中剖面线所示高度曲线图。

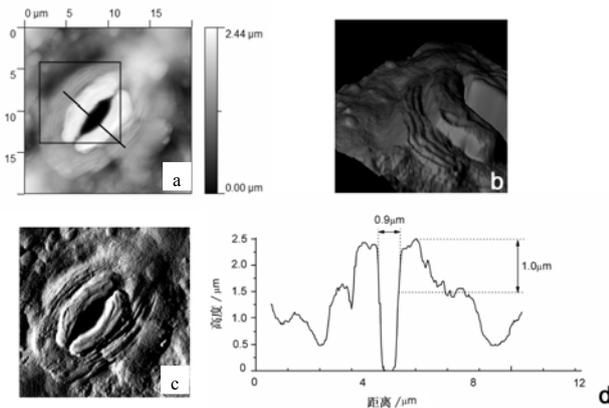
图 2 张开的气孔 AFM 图像

Fig.2 AFM image of an open stoma

随着观察时间的推移，张开的气孔蒸腾作用强烈，叶片所含水分不断降低，保卫细胞也开始失去水分，气孔开始闭合。图 3-a 所示为气孔开始闭合时候的图像，从图 3-c 中可以得到气孔的张开程度变为 0.9 μm，但保卫细胞的高度并没有变化，由

于保卫细胞失去了部分水分，保卫细胞表面略微有皱缩出现。所以气孔的张开、闭合是靠保卫细胞改变自身的弯曲程度造成的。

图 3-b 是图 3-a 的三维重建图，利用在三维软件里的灯光设置，更清晰地看到图 3-a 里不甚明显的覆盖在副卫细胞上的微纤维结构，这些纤维的直径约为 400 nm，间隔为 200 nm 左右。



a 高度图；b a 图中方框所示区域的三维图；c 振幅图；d a 图中剖面线所示的高度曲线图

图 3 闭合的气孔 AFM 图像  
Fig.3 AFM image of a close stoma

通过 AFM 直接进行活体叶片气孔的观察，不但较好地保持了细胞原来的形态，而且还可以进行动态观察，并获取气孔的微观结构图像，包括保卫细胞、副卫细胞以及用普通方法很难观察到的覆盖在副卫细胞上的微纤维结构等。AFM 不仅可以研究细胞的二维或三维形貌和表面微观结构，甚至还可以研究细胞的弹性、粘度和力学性质等。不仅可以研究细胞的静态结构，还可以研究细胞的动态过程。所有这些均有待于 AFM 技术的发展、成熟和普及，以及在生物研究上的应用进展。

#### 参考文献:

- [1] Zeiger E .The biology of stomatal guard cells[J] . Annual Review of Plant Physiology , 1983 , 34(1) : 441-474 .
- [2] 张菊平, 周快索, 巩振辉, 等 . 用气孔保卫细胞周长鉴定辣椒植株的倍性[J] . 西北农业学报, 2007(2) : 133-141 .
- [3] 于海秋, 武志海, 沈秀瑛, 等 . 水分胁迫下玉米叶片气孔密度、大小及显微结构的变化[J] . 吉林农业大学学报, 2003(3) : 797-801 .
- [4] Serna Laura , Fenoll Carmen . Stomatal development and patterning in *Arabidopsis* leaves[J] . Physiologia Plantarum , 2000 , 109(3) : 351-358 .
- [5] 王晓楠, 石雷, 张大维, 等 . 木贼科气孔器的扫描电镜观察[J] . 植物研究, 2006(2) : 147-150 .
- [6] Serna Laura , Fenoll Carmen . Stomatal development in *Arabidopsis* :How to make a functional pattern[J] . Trends in Plant Science , 2000 , 5(11) : 458-460 .
- [7] 汪暖, 陈志雄, 刘向东 . 利用激光扫描共聚焦显微镜研究拟南芥气孔发生与发育[J] . 武汉植物学研究 , 2007(2) : 109-111 .
- [8] Zhang Xiao , Zhang Lin , Dong Facai , et al . Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*[J] . Plant Physiol , 2001 , 126(4) : 1438-1448 .
- [9] Binnig G , Quate C F , Gerber C H . Atomic force microscope[J] . Physical Review Letters , 1986 , 56(9) : 930 .
- [10] 郑伟民, 蔡继业 . 原子力显微镜在DNA领域中研究应用[J] . 现代仪器 , 2006(1) : 9-12 .

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 胡东平