

观察植物根的内皮层细胞壁内表面细微结构的表面物理技术

徐建华^{1,*} 李冰石² 张建华³ 刘鹏¹ 董宇辉¹ 孙家林⁴

¹中国科学院高能物理研究所, 北京 100049; ²中国科学院化学研究所, 北京 100080; ³香港浸会大学生物系, 香港;

⁴清华大学物理系, 北京 100084

Surface-physical Technique for the Observation of Fine Structure of the Inner-wall Surface of Plant Root Endodermis

XU Jian-Hua^{1,*}, LI Bing-Shi², ZHANG Jian-Hua³, LIU Peng¹, DONG Yu-Hui¹, SUN Jia-Lin⁴

¹Institute of High Energy Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ²Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; ³Department of Biology, Hong Kong Baptist University, Hong Kong, China; ⁴Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China

提要 采用传统的生物学方法与物理学中表面技术相结合的技术, 探讨了植物根内皮层的营养运输机制的直接证据问题。

关键词 植物根; 内皮层; 表面物理技术; 原子力显微镜

植物根除具有机械支持功能之外, 还有一种作用, 即从土壤中吸收水分和无机盐, 向上输送到茎和叶以供植物生长发育的需要。根吸收水分后通过根表皮、皮层和中柱鞘, 最后到达木质部。在研究植物根生理功能过程中, 位于根皮层内侧、靠近中柱鞘的内皮层结构是人们长久以来较为注视的问题(Nagashi 等 1974; 徐建华等 2002)。尤其是初生根中的凯氏带结构和功能, 更是困扰人们的难题。迄今生物学中的传统技术, 如切片和酶解等方法一直没有大的突破和进展。上世纪近 90 年代出现的小檗碱-苯胺蓝对染法(Brundrett 等 1988; 徐建华等 2004)在一定程度上提高了观察内皮层凯氏带存在与否以及所在具体位置的灵敏度和精确度, 其可视性有所增强, 但对深入研究内皮层的结构和生理功能依然受技术上的制约。

近年来, 物理学领域以原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)扫描为代表的表面物理技术蓬勃发展, 这些技术在生物学领域中的应用也日益受到关注, 从而也极大地促进了生物学研究的深入和发展(白春礼 1992; 邢树平等 2000)。本文尝试用原子力显微镜观察植物根内皮层细胞壁的内表面结构以了解其纳米尺度范围内的细微结构, 这对于探讨植物根的水分和溶质运输机制来说, 可能有些帮助。为确保实验的准确性, 我们也同

时以传统的扫描电子显微镜(scanning electronic microscopy, SEM)和小檗碱-苯胺蓝对染技术与之作了对比。

材料与amp;方法

1 材料

培养玉米(*Zea mays* L.)和小麦(*Triticum aestivum* L.)幼苗时, 将玉米和小麦种子浸泡在 10% NaCl 溶液内进行表面消毒 15 min, 流水冲洗 6 h 后移到铺有几层纱布的培养皿中, 放于培养箱中萌发 4 d, 箱中温度为 25~27℃, 光照时间 10 h·d⁻¹, 光照强度为 400 μmol·m⁻²·s⁻¹。根长约为 20 mm 时, 抽取其内皮层的中柱用于实验(Priestley 和 North 1922)。抽取出来的中柱表面就是实验所要观察的内皮层细胞壁的内表面。培养用溶液为 Hoagland 培养液。

2 方法

(1)染色: 0.1%小檗碱染色 1 h 后用蒸馏水冲洗, 再置于 0.05% 苯胺蓝中 0.5 h 并再次用蒸馏水冲洗几次, 然后浸入等比例的甘油和 0.5% FeCl₃ 溶液中 5 min; 最后用 0.1% FeCl₃ 固定后用荧光显微镜(Olympus BX-50型)观察, 挑选所需样

收稿 2006-05-09 修定 2006-08-29

资助 国家自然科学基金(10174043)。

*E-mail: xujianhua@ihep.ac.cn, Tel: 010-88235978

品并照相。

(2)原子力显微镜(AFM)扫描:将经荧光显微镜观察后挑选出来的细胞内残余物较少的内皮层中柱固定在样品台上。实验所用AFM为Nanoscope III型扫描探针显微镜(digital instrument santababara, Digital Instruments Inc.)。微悬臂长200 nm,力常数 $0.12 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ 。AFM有3种不同的常用模式,即接触式(contact mode)、轻敲式(tapping mode)和非接触式(noncontact mode)。接触模式中针尖始终同样品接触,在样品表面上滑动,通常产生稳定、高分辨率的图像,因此我们选择在接触模式下收集,数据采集为Height式。AFM将图像转化为Tiff格式文件并移到Macintosh 7200(90)计算机中,纹孔的直径采用NIH Image 1.59/1.68软件测量。

(3)扫描电子显微镜(SEM)观察:将经荧光显微镜观察后挑选出来的细胞内残余物较少的内皮层中柱系列脱水,并经临界点干燥后喷金,用Hitachi 800扫描电子显微镜观察照相。

结果与讨论

1 玉米根内皮层表面结构的SEM和AFM观察

从图1可见,SEM和AFM观察到的玉米根内皮层纹孔只是大小有些差别,前者纹孔的直径略小于后者。用SEM观察时,样品需脱水和干燥,其表面喷金后样品会导电;脱水和干燥的样品会收缩,且喷金后纹孔口径会变小。喷金后的样品再置于AFM下扫描时,金粉即呈颗粒状(每个颗粒直径约为10 nm),如果样品表面喷金厚度只有3层颗粒大小的话,测得的纹孔大小至少比实际尺度小30 nm(图2)。而以AFM扫描的不必作处理,基本上是在生理条件下测试,所以其结果更真实可靠。

另外,用SEM和AFM在较大区域内扫描玉米根的内皮层表面所观察到的结果基本上一致,即有些内皮层细胞内壁表面呈波浪起伏状,次生壁加厚不均匀,有绳索状突起,并呈规律性的斜状排列。

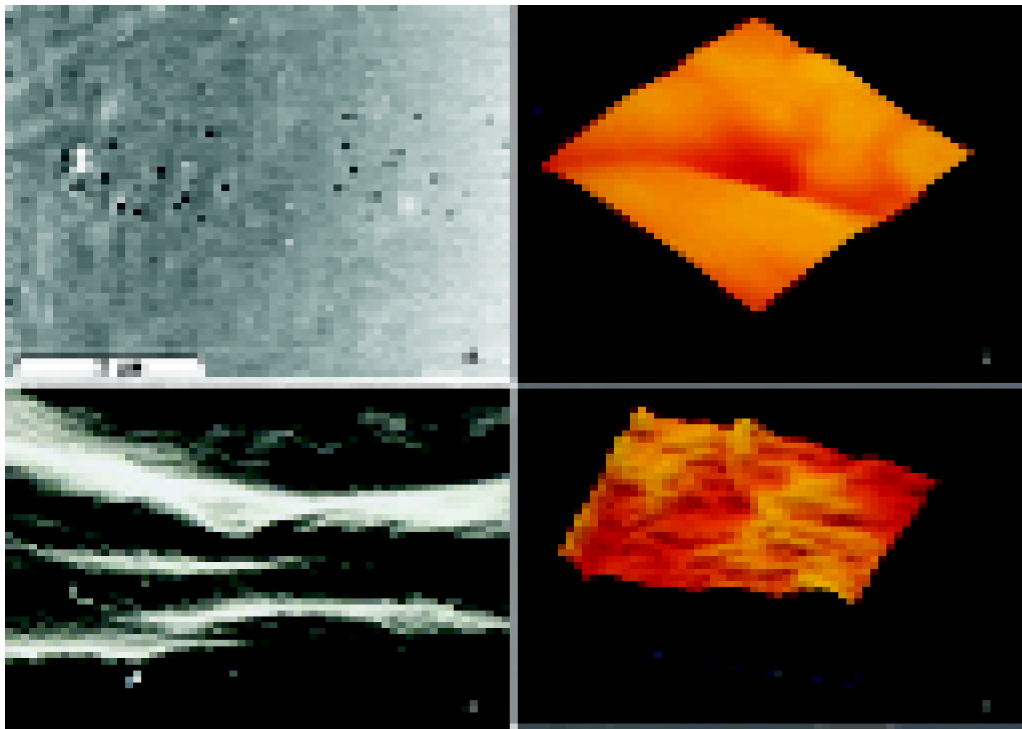


图1 玉米根内皮层细胞壁表面的SEM和AFM观察比较

a和b分别是用SEM和AFM扫描到的玉米根内皮层个体纹孔,b中AFM的扫描范围为 $3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$;c和d分别是用SEM和AFM扫描到的玉米根内皮层细胞壁内的表面结构,c中放大倍数为3 000,d中AFM的扫描范围为 $3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ 。

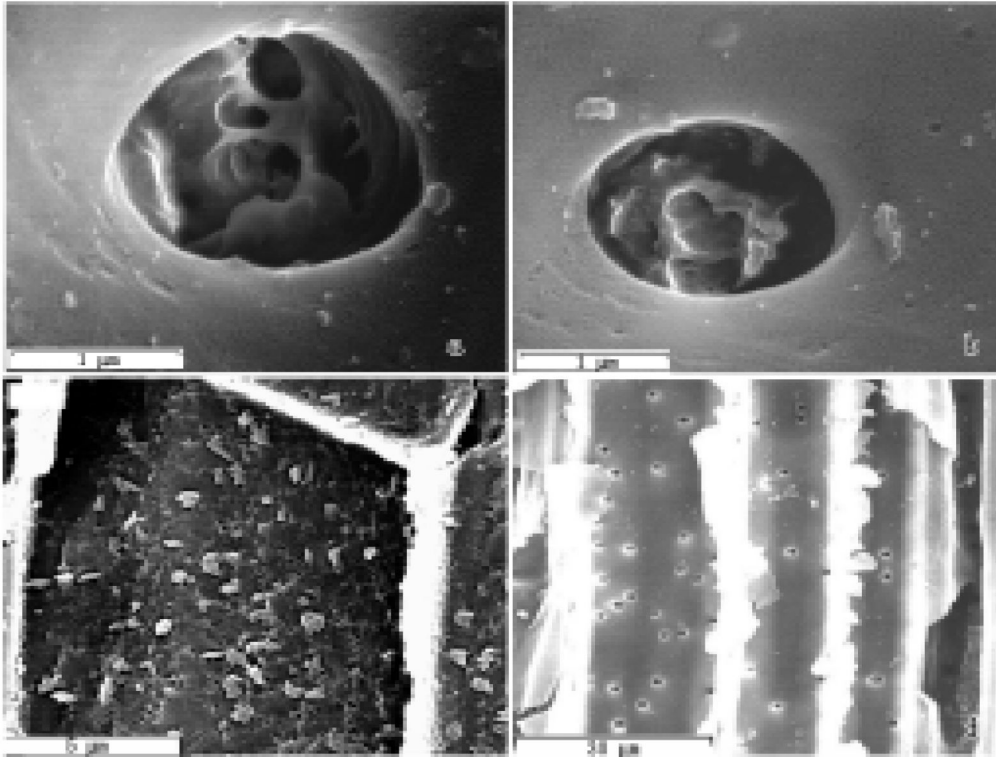


图2 玉米和小麦根内皮层细胞壁表面的SEM观察

a 和 b 为小麦根纹孔内复杂的细胞壁次生结构；c 和 d 分别为玉米和小麦根内的纹孔分布。

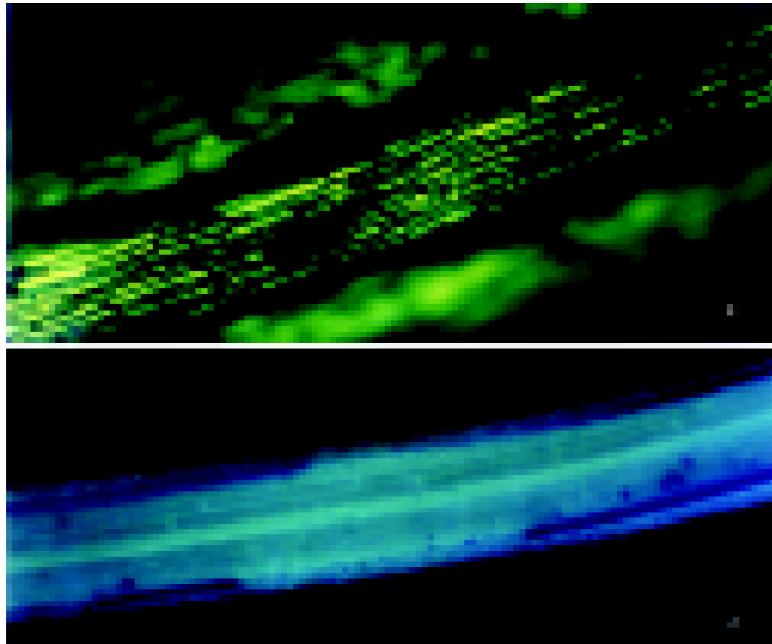


图3 小檗碱-苯胺蓝对染后的玉米和小麦根内皮层中柱的表面观察

a 和 b 分别为玉米和小麦根内皮层中柱。黄色表面区域表示无细胞残余物，可用于观察；蓝色表面区域表示有残余物，观察表面结构时应避开这些“不干净”的区域。

2 玉米和小麦根纹孔的分布和细微结构的比较

玉米根上的纹孔分布有一定的规律,常是多个纹孔成簇分布(图2-c);小麦根上的纹孔则多是零散分布(图2-d)。但小麦根的纹孔内的细胞壁次生结构非常复杂(图2-a、b)。

通常,在根中物质由外向内的运输过程中,直接面对水分和溶质的是内皮层细胞壁内切向壁的内表面,即内皮层中柱的外表面。以往人们多用内皮层中柱研究此种细胞壁的输水速率、离子运输等,或者用酶解后分析其化学物质组成(Zeier和Schreiber 1997; Peterson等 1981a; Steudle和Peterson 1998),而本文直接用SEM和AFM研究其表面的精细结构。但用AFM的探针扫描其表面时,人们可能会对这项技术的可靠性产生疑虑,即扫描到的表面区域是否含有胞内残余物质。为此,我们又采用了常用于观察内皮层次加厚的小檗碱-苯胺蓝对染法(Brundrett等1988; 徐建华等2004)。对染后在紫外激发光下,中柱样品表面即呈现不同颜色,黄色区域为所要观察的内皮层加厚部分,蓝色区域则是内皮层细胞中未撕干净的残余物质(图3),选取残余物质极少的内皮层中柱用于观察即可确保AFM扫描到无残余物质的细胞壁表面。

有关内皮层径向加厚壁的精细结构, Peterson及其同事们已做过许多工作(Peterson等 1981a, b; Peterson和Steudle 1993),多采用传统的组织切片-透射电镜观察等方法。他们得到的结果表明,玉米等禾谷类植物根内皮层细胞壁的结构大体相似:从第二阶段起,木栓层、纤维素不均匀增厚,有大量纹孔,纹孔内含胞间连丝。但由于解剖法的局限性,采用此法常常观察不到完整的表面结构。我们则将几种技术方法结合起来,如取中柱中所要观察的样品表面,用小檗碱-

苯胺蓝对染选择所需的无残余物的表面。传统的表面技术SEM与新的物理表面技术AFM相互印证,取长补短,得到的结果与前人的研究基本上一致,且获取的信息量更直接、详细而真实可靠。

参考文献

- 白春礼(1992). 扫描隧道显微术及其应用. 上海: 科学技术出版社
- 徐建华, 孙家林, 郭继华(2002). 植物根的内皮层结构与生理功能. 植物生理学通讯, 38: 187~192
- 徐建华, 陶冶, 黄艳, 孙家林(2004). 植物根内皮层凯氏带染色的小檗碱-苯胺蓝对染法. 植物生理学通讯, 40: 479~482
- 邢树平, 李冰石, 王琛, 胡玉熹, 林金星(2000). 雪松和水杉花粉外壁亚结构的原子力显微镜研究. 科学通报, 45: 306~309
- Brundrett MC, Enstone DE, Peterson CA (1988). A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin and callose in plant tissue. *Protoplasma*, 146: 133~142
- Nagahashi G, Thomson WW, Leonard RT (1974). The casparian strip as a barrier to the movement of lanthanum in corn roots. *Science*, 183: 670~671
- Peterson CA, Emanuel ME, Humphreys GB (1981a). Pathway of movement of apoplastic fluorescent dye tracers through the endodermis at the site of secondary root formation in corn (*Zea mays* L.) and broad bean (*Vicia faba*). *Can J Bot*, 59: 618~625
- Peterson CA, Peterson RL, Robards AW (1981b). A correlated histochemical and ultrastructural study of the epidermis and hypodermis of onion roots. *Protoplasma*, 96: 1~2
- Peterson CA, Steudle E (1993). Lateral hydraulic conductivity of early metaxylem vessels in *Zea mays* L. roots. *Planta*, 189: 288~297
- Priestley JH, North EE (1922). Physiological studies in plant anatomy. III. The structure of the endodermis in relation to its function. *New Phytol*, 21: 113~139
- Steudle E, Peterson CA (1998). How does water get through roots? *J Exp Bot*, 322: 775~788
- Zeier J, Schreiber L (1997). Chemical composition of hypodermal and endodermal cell walls and xylem vessels isolated from *Clivia miniata*: identification of the biopolymers lignin and suberin. *Plant Physiol*, 113: 1223~1231