

土壤-植物根系微区养分状况的研究

IV. 电子探针制样方法的比较及其应用*

施卫明 徐梦熊 刘芷宇

(中国科学院南京土壤研究所)

摘 要

本文对电子探针分析植物样品的几种制备方法和条件进行了试验。结果表明,直接空气干燥方法使得玉米根的表皮和皮层细胞显著收缩。用4%戊二醛磷酸缓冲液预固定一个小时就可导致根内K和Ca的大量淋失。只有在 -80°C 和 5×10^{-4} Torr以下进行冰冻干燥才能使得到的样品形貌自然,元素保持原位,效率又高。应用此方法对根-土微区营养元素分布状况进行电子探针分析,清晰地显现出,K在根的各个组织部位都有不少存在,但在中柱内浓度更高些。而Ca则是在内皮层和皮层有明显的富集,在根输导组织中没有累积。还可以看到在内皮层以外的组织中积累有较多的Si,表明根表皮和皮层细胞被微生物破坏后,土粒渗入而形成内根际。在根际土壤中同时存在着较多的Si, Ca, Fe, Zn, K和Ti等。

土壤-根系微区的养分状况是土壤和植物两者之间关系的直接反映,有关这方面的研究有着十分重要的意义。但是,由于其研究范围小,要求分辨力高和养分状况保持原位。因此,测定技术在过去一直是这一领域研究中的限制因素^[1]。以往人们应用的放射性自显影^[2]和微电极技术^[3],由于只能局限于少数具有放射性同位素的养分元素和区分的微域界限较粗以及受环境条件影响较大等原因,在应用上受到一定的限制。60年代末发展起来的电子探针显微分析技术不仅能提供微区表面形貌的显微特征,而且能同步的原位分析其元素含量和分布状况。因而已广泛地应用于冶金和地质等领域。同时也是研究土壤-根系微区养分状况比较理想的技术手段。然而,由于植物样品柔软且含水量高,一般须经过固定、干燥和喷镀导电膜等前处理才能进行分析。而这样的处理步骤通常不易保持试样中养分的原位。因而电子探针植物样品的制备比较困难,至今仍未得到满意的解决,限制了电子探针在植物根际微区研究上的应用^[4,7]。为此,寻求一种简便而有效的制样方法是应用电子探针研究根际养分状况的前提。

本文通过对几种植物样品制备方法和制样条件的比较,寻求一种简便可靠的方法,并探讨电子探针应用于根际微区养分分布的研究。

* 在实验过程中得到本所质谱组、电镜组和南京林学院电镜室的大力帮助,谨此致谢。

一、材料和方法

供试土壤为黄河冲积物发育的石灰性砂壤土。土壤 pH 值为 8.5。0.5M NaHCO₃ (pH 8.5) 浸提的速效磷 (P) 为 2.5ppm。1N 中性醋酸铵浸提的速效性钾 (K) 为 72ppm。供试作物为玉米和小麦。

1. 植物的培育和处理: 在水培实验中, 作物种子在湿纱布上于暗室中发芽。待根长出约 2cm 后, 转至营养液中在温室内生长。营养液成分为: (NH₄)₂SO₄ 1.0mM, Na₂HPO₄ 0.75mM, KCl 8.0mM, Ca(NO₃)₂ 1.5mM, MgSO₄ 1.5mM, Fe-EDTA 1.0ppm, H₃BO₃ 0.72ppm, CuCl₂ 0.02ppm, MnCl₂ 0.45ppm, ZnCl₂ 0.06ppm 和 H₂MoO₄ 0.01ppm。溶液 pH 6.5。每隔一周换一次营养液。在土培试验中, 土样经磨细过筛 (20 目), 在每 6000g 土壤中均匀拌入 1.0g NH₄H₂PO₄ 和 1.86g K₂SO₄。土壤水分保持在 15% (相当于最大持水量的 70%)。播入发芽的作物种子在温室中生长。

2. 样品的干燥: 待作物在上述营养液中生长约 20 天后 (三叶期), 用双面刀片取下离根尖 2—3cm 的玉米根段, 用以下几种方法分别进行干燥。

(1) 空气干燥: 将根段用刀片切成约 2mm 厚的切片, 置于空气中让水分自然挥发干燥。

(2) 临界点干燥: 将根段用刀片切成约 2mm 厚的切片, 在 4% 的戊二醛磷酸缓冲液中 (pH 7.2) 预固定 2 小时, 用 1% 锇酸磷酸缓冲液作后固定 2 小时。经酒精系列脱水后, 用醋酸异戊酯液置换。然后将样品在 HCP-2 临界点干燥仪中干燥。

(3) 直接冰冻干燥: 将根段在 5% 的琼脂中迅速浸一下后插入样品座的小孔中用双面刀片切一横断面, 迅速投入液氮中冷冻。同时将铜柱块 (增加热容量用) 也置于液氮中。待温度达到平衡后, 将带样品的样品座在液氮下转至铜柱块上。为防止转移过程中样品表面结霜, 样品需保持在液氮中。在铜柱块下垫一绝热材料, 置于高真空镀膜仪中抽真空使样品干燥。一定时间后停止, 但继续保持真空状态 24 小时。

(4) 戊二醛预固定-冰冻干燥法: 将根段在 4% 的戊二醛磷酸缓冲液 (pH 7.2) 中预固定 1 小时后, 同 (3) 法进行冰冻干燥。

3. 冰冻干燥的温度: 将根段用刀片切成约 2mm 厚的切片, 用液氮冰冻后, 于真空干燥中 -20℃ 下 (低温冰箱中) 和 -80℃ 下 (干冰中) 用 2X-A1 型旋转泵抽真空干燥样品。

4. 样品的观察: 干燥后的样品在 DM-250IV 型镀膜仪中分别喷镀银层。在 20keV, 10⁻⁸A 下用 DX-3A 型扫描电子显微镜 (附 X-射线波长色散仪) 分析样品的元素 K 和 Ca 等的分布状况。分析晶体为 PET。或用 EXAC-2000 X-射线能量色散仪分析元素的分布状况。样品的二次电子图像和元素 X 射线分布图都用照片记录。

二、结 果

(一) 几种干燥方法的比较

由各种方法得到的结果表明, 用空气干燥的方法, 样品收缩显著, 细胞破碎和皱缩。这在皮层和表皮细胞表现得更为明显。但元素分布的结果表明, 养分元素移位的现象不明显。K 在中柱、皮层和表皮细胞中都有不少存在。且仍表现出中柱内的 K 高于皮层和表皮细胞中 K 的趋势。而 Ca 则是在中柱内很少存在, 而大量积累在表皮和皮层细胞上 (图版 I, 照片 1)。K 和 Ca 的分布趋势与一般认为的正常 K 和 Ca 的分布方式比较相近。这似乎表明切面上表皮、皮层和中柱细胞物质间并未产生流动污染。但因得到的组织形貌

极差,无法精确地确定组织部位与元素分布的对应关系。因此,这种方法不能作为电子探针植物样品的制备方法。

用临界点干燥和戊二醛预固定-冰冻干燥得到的样品,整个根的形貌较佳,没有明显的细胞破损或皱缩(图版 II, 照片 3a)。这说明,用这两种方法都能较好地保存样品天然状态的精细结构。但元素分布的结果表明,K 和 Ca 在根中都已很少存在(图版 I, 照片 2 和图版 II, 照片 3)。而且即使只用戊二醛预固定 1 小时,样品中 K 和 Ca 也已发生移位和淋失。所以,这两种方法也不适于电子探针分析中植物样品的制备方法。

(二) 冰冻干燥温度的比较

冰冻干燥温度是冰冻干燥方法中的一个重要参数。试验结果表明,在 -20°C 下冰冻干燥的样品,根形貌发生了很大的变化。其中,皮层细胞的破损和皱缩最为明显。而当干燥温度为 -80°C 时,得到的根形貌比较好,细胞充实而完整。这表明,当冰冻干燥的温度低于 -80°C 时,能使样品组织保持在自然状态。按(3)法直接冰冻干燥的样品,也呈现出良好的形貌(照片 4a)。而且根毛挺立,根尖部分表面仍然保持着不少粘液物质。同时,元素分布结果也表明,K 在表皮、皮层和中柱都有大量存在。但中柱内的 K 含量似乎要高于表皮和皮层中的量。而 Ca 却是在皮层和表皮层有累积,在中柱内则很少存在(图版 II, 照片 4)。与通常的根内 K 和 Ca 分布规律相一致^[5,7]。

(三) 电子探针在根际微区养分状况研究上的应用

电子探针可以分析根际和根内各种养分的分布状况。对离根尖 3—4 厘米的玉米根段进行整个横断面扫描结果表明,K 在各个组织部位都有不少存在。其中以在中柱内浓度更高(图版 III, 照片 5b)。而 Ca 则在内皮层有明显的富集(图版 III, 照片 5c)。这就证实了 K 和 Ca 在植物根内的运输途径是不同的。Ca 通过质外体途径运输而被内皮层上发育的凯氏带所阻碍,从而进入中柱内输导系统的量要较 K 少得多。而 K 则表明不受内皮层的影响。从 Si 的分布状况可以看到, Si 也主要积累在内皮层以外的组织中,但与 Ca 的分布相比,不同之处在于内皮层处并没有明显的富集区,但在根际土壤颗粒含量较高(图版 III, 照片 5d)。同时,从根组织横断面的二次电子图像上也可以观察到这部分根系的表皮和皮层细胞组织已被微生物侵入而破坏,部分土壤颗粒已渗入到内皮层以外的细胞组织中,而与 Si 的分布状况相符合。看来这部分已经形成为内根际(Endorhizosphere)。此外,电子探针还可以对某一微区或某一局部进行点分析。例如,对离根尖 2—3 厘米的小麦根际土壤中进行分析的结果表明,存在大量的 Si, Ca, Fe, Zn, K 和 Ti 等(图版 III, 照片 6)。但根组织中则不含 Ti, 而 S, P, K 和 Mg 峰较明显。

三、讨 论

作为电子探针分析用的植物样品,除要求得到的样品形貌保持自然状况外,还要求样品中的元素也保持原位,没有淋失和再分布现象。导致新鲜生物样品皱缩和变形的最重要原因是水分自然挥发时存在的表面张力的影响。因此,要避免直接空气干燥。临界点干燥法是利用临界点时表面张力为零,将液体变成气体而干燥样品。因而能较好地保存样品的天然状态的微细结构。被认为是目前观察样品形貌的一种较理想的制备方法^[6]。

但由于制样过程中需要固定、脱水和置换等步骤,因而小分子物质易于淋失。冰冻干燥是利用冰升华时无表面张力的原理,用液氮等骤冷植物样品使细胞内水分变成无定形冰。并保持在低温下抽真空将冰直接升华成气态而干燥样品。因此,理论上能很好地保持样品的天然形貌,而且又避免了使用化学固定剂和脱水剂,从而可以较好地使细胞内物质保持原位。然而,由于冰冻干燥过程比较复杂,操作不当极易造成样品的冰晶和重结晶损伤。因为生成的无定形冰晶是不稳定的,会发生重结晶现象。并且重结晶速率随温度升高而急剧加快,从而产生大冰晶损伤细胞。而且,由于细胞内一部分结合水的冰点为 -60°C ^[6]。因此,一般冰冻干燥的温度应保持在 -80°C 以下^[6]。但温度越低,冰冻干燥速率就越小。

虽然用固体 CO_2 (-80°C)进行冰冻干燥也得到了较好的样品形貌,但固体 CO_2 的加入降低了真空度而增加了冰冻干燥时间。因为真空度对冰冻干燥速率有极大影响。例如,在 -80°C 下和 5×10^{-3} Torr下(2X-A1型旋转真空泵),一般需连续抽真空10天左右才能使样品干燥,效率很低。而液氮冷冻后置于镀膜仪中在约 10^{-4} Torr下进行冰冻干燥,尽管温度低于 -80°C ,但总共冰冻干燥时间不到24小时。而且,后者方法干燥的样品中K和Ca分布与其一般分布规律相一致。由此表明,样品中的一些易移动性物质如K在制样过程中未发生移位和再分布。由于K在植物体内主要是以离子态存在,是最易移动的元素之一。当测定的样品中K的分布未变化时,则可以认为其它元素的分布在制样过程中也未发生变化。

样品表面的凹凸不平对X射线的探测影响很大。尤其当用波谱仪进行X射线探测时,这种影响更甚。因此,观察的样品表面应尽可能平。我们在实验中观察到当带根际上的根进行冷冻断裂时,根际土壤的分断裂面常起伏不平。而采取在冷冻之前用刀片迅速切一横断面似乎有利于改善这一情况。其原因可能是土壤和植物根的硬度不一样,根际土壤内部的硬度也不一致,所以冷冻断裂常会造成断裂面上起伏较大。某些研究者采取在电子探针内配备一个特定冷冻台让样品直接在冷冻条件下进行观察的方法^[5]。这种方法被认为是目前最为简便、结果也较可靠的方法。他们报告的结果同我们的结果颇为一致。因此,可以认为本文中的直接冰冻干燥方法可以用作电子探针研究植物根-土界面上营养元素状况的制样方法。而且,由于本方法所需设备简单,样品直接置于样品座上的小孔内在镀膜仪中进行冰冻干燥后即可直接进行喷镀。制样时间也短,是一种值得推荐的制样方法。

在制样方法问题解决以后,电子探针可以用来原位分析根-土界面上各种营养元素的分布状况,为养分的吸收和转运机制研究提供依据。同时,电子探针在研究各营养元素的相互作用方面也是有用的技术手段。但是,电子探针得到的是全量的结果,检出限量也尚不够低。因此,需要进一步改进测试技术,利用组织化学和沉淀技术等手段,使之发挥更大的作用。

参 考 文 献

- [1] 刘芷宇, 1980: 土壤-根系微区养分环境的研究概况。土壤学进展, 第3期, 1-11页。
- [2] 许曼丽、刘芷宇, 1984: 应用放射性自显影研究根-土界面的养分吸收。土壤, 第16卷2期。
- [3] 许曼丽、刘芷宇, 1982: 土壤-根系微区养分状况的研究 I, 微钾玻璃电极的应用。土壤学报, 第19卷4期。

367—374 页。

- [4] Chino, M., 1977: Application of electronprobe x-ray microanalysis to the localization of chemical elements within and around rice roots grown in soils under submerged conditions. JARQ, 11: 129—135.
- [5] Chino, M., 1981: Species difference in Ca and K distribution within plant roots. Soil Sci. Plant Nutri, 27: 487—503.
- [6] Hall, J. L., 1978: Electron Microscopy and cytochemistry of plant cells. Elsevier/North-Holland Press.
- [7] Tan, K. H., and O. Nopamornbodi, 1979: Electron microbeam scanning of element distribution zones in soil rhizosphere and plant tissue. Soil Sci., 127: 235—241.

THE NUTRIENT STATUS OF SOIL-ROOT INTERFACE

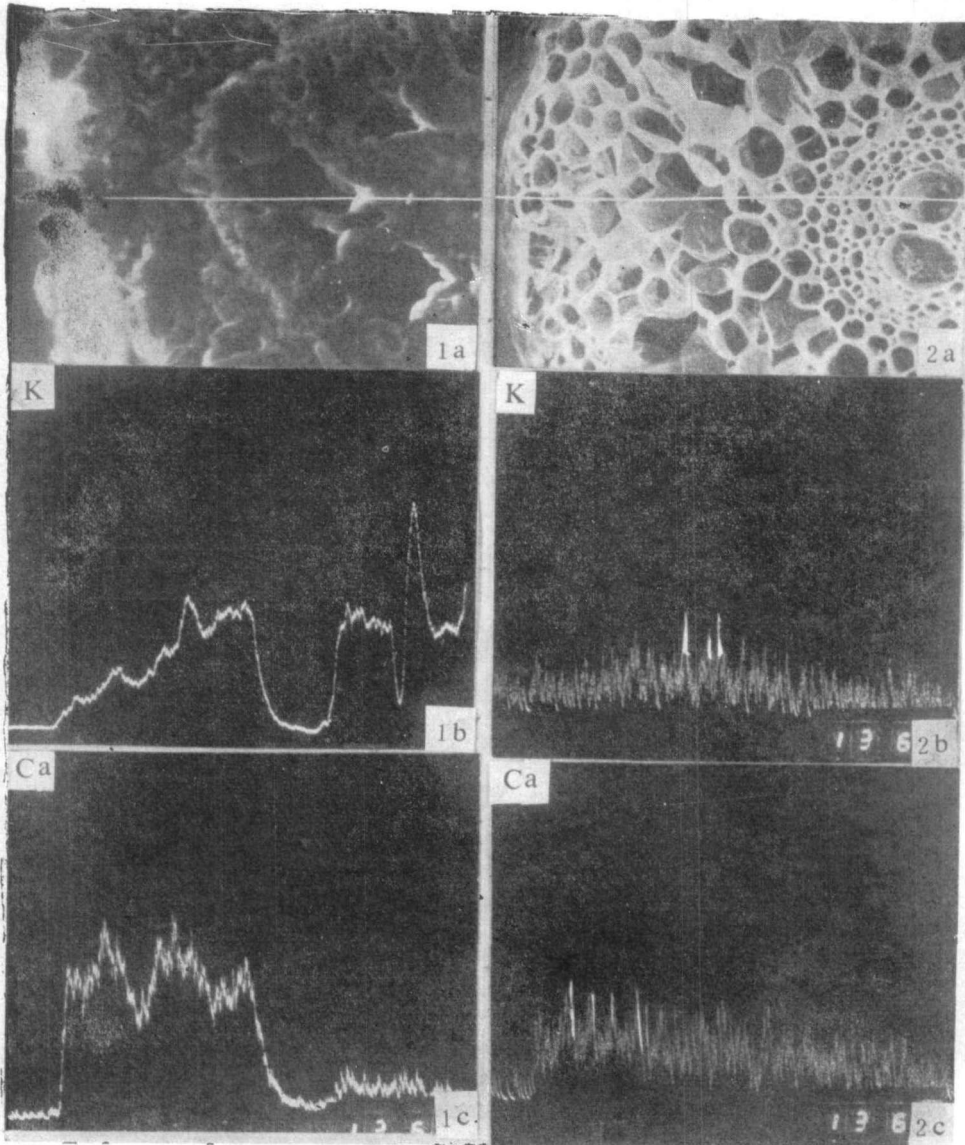
IV. STUDY ON SAMPLE PREPARATION PROCEDURE FOR ELECTRON MICROPROBE AND ITS APPLICATIONS

Shi Weiming, Hsu Monxiong and Liu Zhiyu

(*Institute of Soil Science, Academia Sinica, Nanjing*)

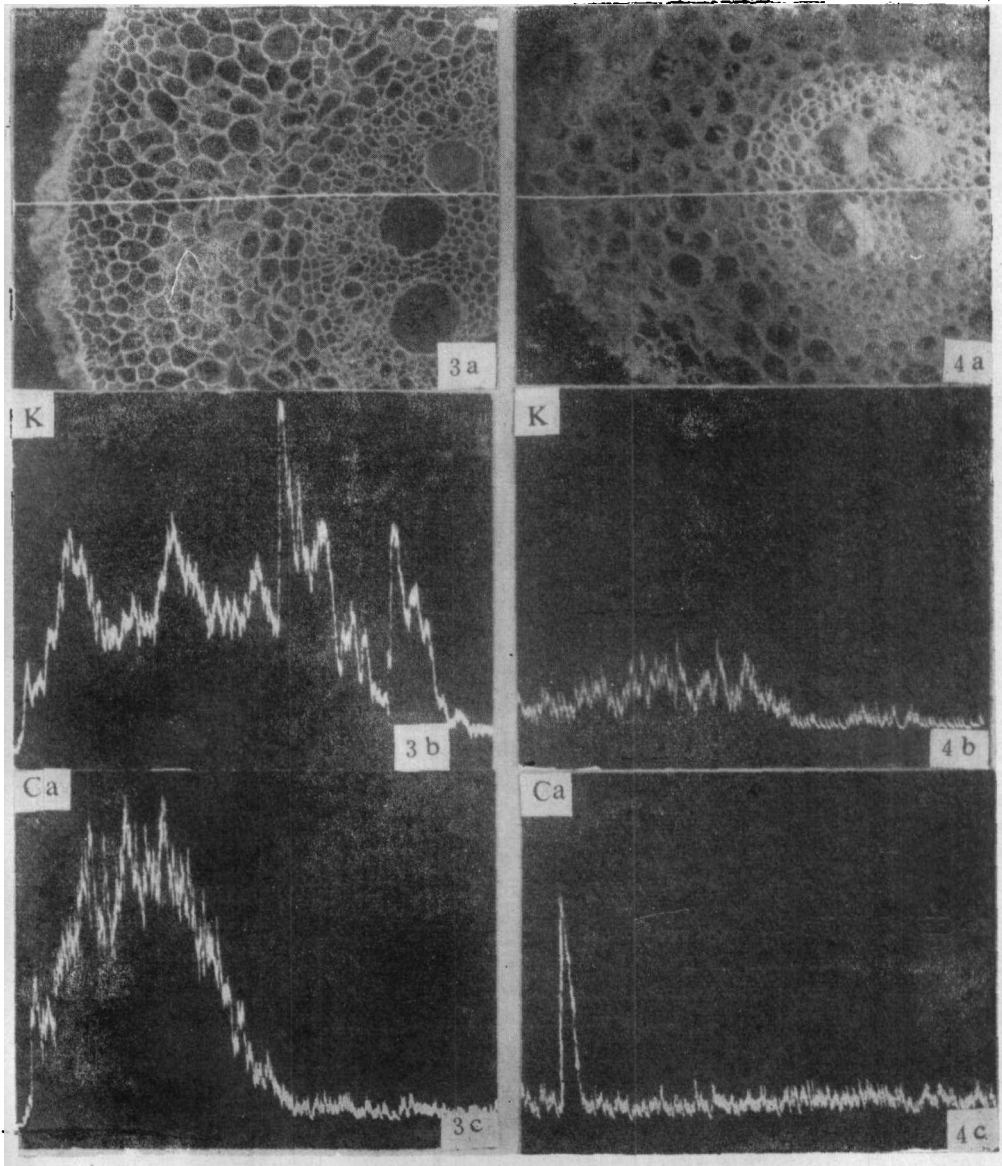
Summary

This paper presents the comparison of the preparation methods of plant tissue for electron microprobe x-ray analyzer. It has been shown that epidermis and cortex of maize root were apparently shriveled with air drying method. Large amount of K and Ca were removed out of the root prefixed for 1 hour with 4% glutaraldehyde. Only with freezing-drying technique at about 5×10^{-4} Torr and below -80°C , could the morphology of the sample obtained be kept in original feature and elements be kept *in situ*; besides, this method was high in efficiency. Results obtained from the samples prepared with this method and investigated by electron microprobe showed that a considerable amount of K was detected within the cells of cortex and endodermis and an even larger amount of K was concentrated in the stele. But Ca was accumulated in the cortex and the endodermis and little was found in the conducting tissue of root. A rather high concentration of Si was also observed in the tissues outside the endodermis of the root. This indicates that soil particles enter the root and thus the endorhizosphere is formed after the cells of the epidermis and the cortex have been destroyed by the soil microbes.



照片 1—2 不同制样方法对玉米根内元素分布的影响 (1a 和 2a 分别为空气干燥法和临界点干燥法得到的玉米根组织横切面的二次电子图像(220×)。1b, 1c, 2b 和 2c 分别为各自的 K 和 Ca 的分布状况)

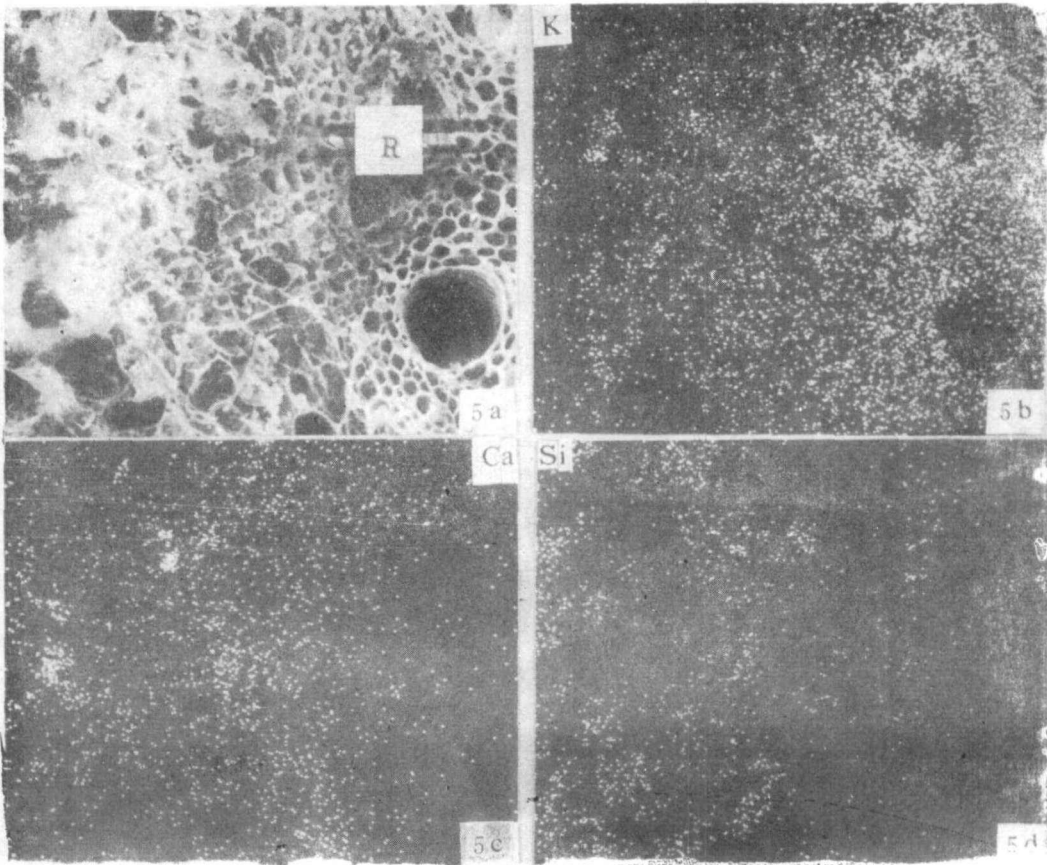
Photo 1—2 Elements distribution in the corn root prepared with the methods of air drying (1) and critical point drying (2). a: secondary electron images of the cross section of the root; b and c are line profiles of distribution of K and Ca along the white line shown on SEI



照片 3—4 不同制样方法对玉米根内元素分布的影响 (3a 和 4a 分别为戊二醛-冰冻干燥法和戊二醛预固定冰冻干燥法得到的根组织横切面的二次电子图像 (220×)。

3b, 3c, 4b 和 4c 分别为各自的 K 和 Ca 的分布状况)

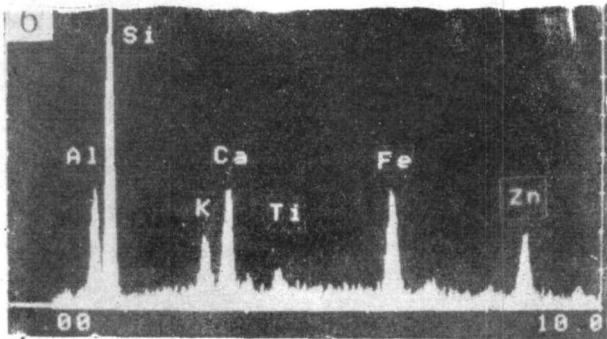
Photo 3—4 Effects of preparation procedures on the elements distribution in the corn root. 3a and 4a are the SEM micrographs of cross sections of root prepared with methods of direct freeze-drying and glutaraldehyde prefixed freeze-drying, respectively; b and c are line scans of K and Ca along the white line shown on SEM



照片 5 K, Ca 和 Si 元素在玉米根内及其根际土壤中的分布

5a. 玉米根横断面 (200×) (RS: 根际土, R: 根组织); b, c, d 分别为 K, Ca 和 Si 的分布状况]

Photo 5 Distributions of K, Ca and Si in the corn root and in its rhizosphere. a: secondary electron images of cross section of the root (R) and of rhizosphere soil (RS); b-d are x-ray images for distributions of K, Ca and Si



照片 6 小麦根际土壤中各元素的存在状况

Photo 6 Characteristic x-ray spectrum of the area of the wheat rhizosphere soil by spot analysis