

毛竹植硅体微观形态及稳定性的扫描电镜初探

赵丽华, 黄程鹏, 王悦悦, 黄张婷

(浙江农林大学 理学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 为了揭示竹子植硅体表面形态和结构, 探究植硅体在缓冲液浸泡后形态是否稳定, 以毛竹 *Phyllostachys edulis* 叶片为研究材料, 采用微波消解法、湿灰化法和干灰化法, 提取毛竹叶片中的植硅体。对提取的植硅体经镀金膜处理, 用扫描电子显微镜(SU-8000 Hitachi)观测。结果表明: 毛竹植硅体具有多种形态。微波消解法提取的毛竹植硅体长为 12~14 μm , 宽为 7~10 μm , 植硅体呈现长鞍形(竹节形), 图像细节清晰, 植硅体形态完整; 湿灰化法和干灰化法提取的毛竹植硅体呈哑铃形, 长约为 12 μm , 连接处宽度约为 4 μm , 两端的宽度约 8 μm , 并且用湿灰化法提取的毛竹植硅体还可见微小突起。微波消解法是提取毛竹植硅体比较理想的方法。微波消解法提取的植硅体在 pH 10 的硼酸缓冲液中浸泡 15 d 后的微观形态可见: 植硅体外表已出现溶蚀坑, 表面变粗糙, 可见硅质颗粒, 呈现为聚集分布。说明植硅体表面已被破坏, 呈现不稳定状态。图 2 参 22

关键词: 植物学; 毛竹; 植硅体; 扫描电子显微镜; 稳定性; 微观形态

中图分类号: S718.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2018)06-1177-05

Stability of *Phyllostachys edulis* phytolith by scanning electron microscopy

ZHAO Lihua, HUANG Chengpeng, WANG Yueyue, HUANG Zhangting

(School of Sciences, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: In order to reveal the surface morphology and structure of bamboo plant phytolith and explore the stability of phytolith after strong alkali soaking, the leaves of *Phyllostachys edulis* were used as the research material to extract the phytolith by using microwave digestion method, wet ashing method and dry ashing method. The extracted phytolith was treated with gold plated film and observed by scanning electron microscope (SU-8000 Hitachi). The results showed that the phytoliths of *Ph. edulis* had various forms. The length of phytolith extracted by the microwave digestion method was 12–14 μm ; the width of phytolith was 7–10 μm ; the phytolith presented a long saddle shape (slub shaped); the image details were clear and the morphology of the *Ph. edulis* was complete. The phytolith extracted by wet ashing method and dry ashing method were dumbbell shaped with a length of about 12 μm . The width of the joint was about 4 μm and the width of the ends was about 8 μm . The phytolith extracted by wet ashing could also showed tiny protuberances. Microwave digestion was an ideal method to extract Phytolith from *Ph. edulis*. The micromorphology of the phytolith extracted by microwave digestion method could be seen after soaking in the boric acid buffer solution with a pH value of 10. The surface of the phytolith appeared corrosion pit and became rough; and the silica particles presented aggregation distribution. It indicated that the surface of the phytolith was damaged and unstable. [Ch, 2 fig. 22 ref.]

Key words: botany; *Phyllostachys edulis*; phytolith; scanning electron microscope; stability; micromorphology

植物硅酸体, 简称植硅体, 是植物内的含水非晶态二氧化硅(SiO_2)颗粒, 存在于植物不同部位的细胞内^[1-2]。植硅体碳因具有很强的抗腐蚀、抗分解、抗氧化等特性^[2-3], 可在土壤中保存数千年乃至万年

收稿日期: 2017-12-18; 修回日期: 2018-04-27

基金项目: 浙江省科技计划项目(2015C37069, 2016C33028)

作者简介: 赵丽华, 高级实验师, 从事扫描电子显微镜研究。E-mail: lhzhao8160@126.com

之久^[4],是陆地生态系统长期固碳的主要机制之一^[5-6],对调节全球碳平衡和应对气候变化意义重大。当前对植硅体的研究主要集中于古环境与古气候重现、农业与环境考古、古生态以及植物分类学等方面,基于宏观估测和默认植硅体恒久稳定的前提进行,因此学界对土壤中植硅体的稳定性存在很大争议。PARR等^[7-8]发现:经过2 000 a的分解,土壤中植硅体碳质量分数从仅占表层土壤有机碳不到10%的比例,上升到82%,表明土壤中植硅体碳的封存是一个长期积累的过程^[9]。WILDING等^[4]发现:植硅体中碳的放射性年龄约为1.33万a。因此,植硅体具有长期稳定性。也有研究认为植硅体是不稳定的。如FRAYSSE等^[10]发现竹林土壤中的植硅体的溶解度等同于玻璃质硅石,是石英的17倍;BARTOLI等^[11]认为植硅体的溶解速率比硅酸盐矿物高一个数量级^[11];CONLEY等^[12]发现:保存死亡植物的地方,水溶性硅的输出明显增加。竹类作为禾本科Poaceae中典型的硅富集植物,植硅体碳含量高,提取、纯化相对方便^[13-14]。其次,竹类植物分布广泛,种类丰富^[15],不同生境竹种差异大^[16],为比较不同竹种植硅体碳稳定性差异和微观形态特征提供了理想的材料。选择竹类植物为研究对象,对揭示植硅体碳稳定性机理和准确估测竹类植硅体碳封存潜力具有双重意义。扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)是由电子光学技术、真空技术、精细机械结构以及现代计算机控制技术等共同组成的电子光学仪器^[17],在植物研究工作中主要被应用于植物来源和种类鉴定、植物微形态学研究以及植物生长的优劣与环境污染等质量控制^[18-19]。近年来,随着植物和土壤植硅体碳研究的深入,扫描电子显微镜等先进仪器也被应用到植硅体碳测定上^[20-21]。本研究以毛竹*Phyllostachys edulis*叶片为材料,利用扫描电子显微镜的高清成像功能检测植硅体微观形态特征,从微观形态上研究毛竹植硅体的稳定性,建立植硅体稳定性微观表征方法,为深入开展植硅体碳研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 毛竹植硅体样品制备

1.1.1 毛竹叶片样品采集 在野外调查基础上,采集杭州市临安区青山镇毛竹叶片约500 g。样品带回实验室,用软毛笔轻扫除去表面灰尘和其他杂物,过程中需注意不损伤毛竹叶片样品。用吹气球吹净后,蒸馏水进行清洗。在105℃下杀青20 min,再在75℃下烘24 h以上,磨碎备用。

1.1.2 植硅体提取 采用微波消解法、湿灰化法和干灰化法提取毛竹叶片中植硅体。①微波消解法:称取毛竹叶片样品0.300 0 g,加4.5 mL质量分数为65%的硝酸(HNO₃),3.0 mL质量分数为30%的过氧化氢(H₂O₂),1.0 mL质量分数为36%的盐酸(HCl),置于微波消解仪中,消解2 h后取出,离心清洗^[7]。提取后的植硅体,采用Walkley-Black法^[22]确保除去植硅体外残留的有机碳等物质。65℃烘干24 h。②湿灰化法:取0.100 0 g毛竹叶片样品,置于100 mL烧杯,加入约10.0 mL质量分数为65%的硝酸(HNO₃),于电热板上缓慢加热,使样品内有机质逐渐被氧化,直至有机质氧化完全,样品不再呈黏稠,溶液澄清为止。再加入2 mL 100 g·kg⁻¹的稀盐酸清洗,以去除附着的钙离子;去离子水清洗2次,无水乙醇清洗2次,65℃烘干24 h。③干灰化法:取0.100 0 g毛竹叶片样品置于500℃的马弗炉中灰化6 h,取出,再加100 g·kg⁻¹的稀盐酸清洗,溶解灰分中的钙离子,离心清洗2次,65℃烘干24 h。

1.1.3 植硅体溶解度试验 称取微波消解法提取的纯净毛竹叶植硅体50 mg,放入50 mL的塑料离心管中,加入0.4 mol·L⁻¹的硼酸缓冲液45.0 mL(pH 10,浸泡用)。摇匀后放置于恒温振荡机中,设置温度为50℃,振动频率为70 r·min⁻¹,振荡15 d。抽取摇匀的悬浊液1 mL置于微量离心管中,10 000 r·min⁻¹离心10 min;在含有植硅体的沉淀中加入超纯水,10 000 r·min⁻¹清洗10 min,直到清洗干净。沉淀烘干后备用。

1.2 植硅体扫描电镜分析前处理

称取20 mg已提取的植硅体样品,分散在100 mL质量分数为7 g·kg⁻¹的甘油中;用定量吸管吸取0.01 mL制样,红外线灯烘干。采用离子溅射镀膜法进行植硅体样品镀膜。将上述烘干后的植硅体样品粉末均匀地撒在卡片纸上,用粘有导电胶的扫描电镜样品台沾取样品。样品及样品台置于BC-II离子溅射仪中进行真空喷镀,喷镀时金靶材处于阴极,调整靶材和样品台合适的距离,抽真空后通入微量氮气。两极间加电场后产生辉光放电,并调节电流大小。重复多次至获得最佳的镀膜真空度和电流值。

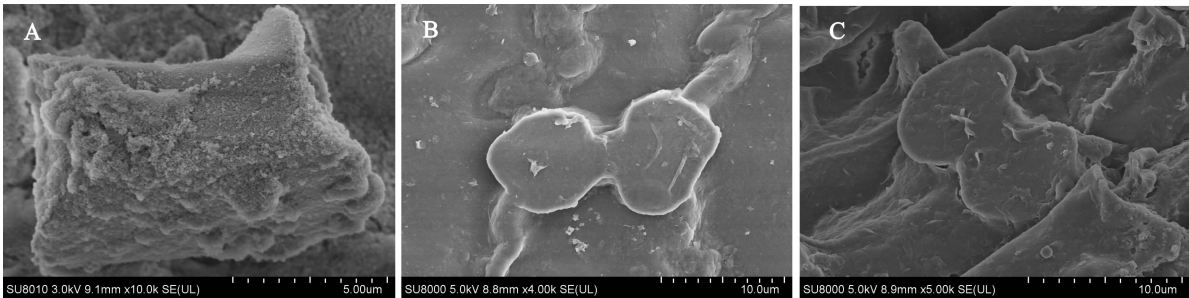
1.3 电镜观察

前处理完成后，放入场发射扫描电子显微镜中(型号为 SU-8000 Hitachi)；调节灯丝饱和点、光阑对中、光阑合轴、消象散调节和聚焦观测等，可获得清晰的表面形貌植硅体微观表面形貌图像。

2 结果分析

2.1 3 种不同方法提取的植硅体的微观形态特征

由图 1A 可见：微波消解法提取的毛竹植硅体长为 12~14 μm ，宽为 7~10 μm ；植硅体呈现长鞍形(竹节形)，图像细节清晰，植硅体形态完整，说明微波消解法是一种获得植硅体理想形貌的方法。用干灰化法(图 1B)和湿灰化法(图 1C)提取的毛竹植硅体，除长鞍形外，还观察到哑铃形；植硅体长为 12 μm ，连接处宽度为 4 μm ，两端的宽度为 8 μm ；用湿灰化法提取的毛竹植硅体还可见微小突起(图1C)。



A. 微波消解法；B. 干灰化法；C. 湿灰化法

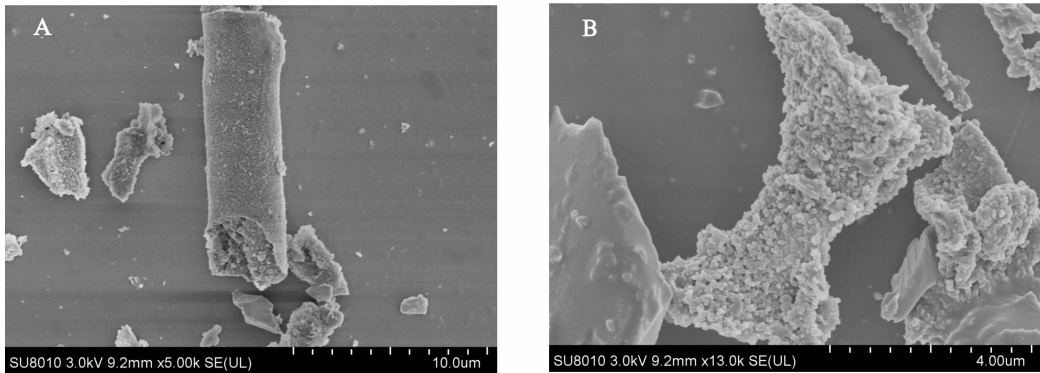
图 1 单个植硅体扫描电子显微镜图片
Figure 1 SEM graph of phytolith

由图 1 可知：3 种提取毛竹植硅体的方法均能获得清晰的植硅体微观形态，但相比而言，微波消解法所展现的细节最为丰富、清晰，可以观察到植硅体表面的溶蚀坑、破碎、粗糙度等微形态变化特征，能保留植硅体的细节形貌不被破坏。因此，微波消解法为最佳提取方法，更有利于探究植硅体的微观形貌及其稳定性。

2.2 植硅体稳定性的电镜分析

微波消解法提取的植硅体经 pH 10 的硼酸缓冲液中浸泡 15 d 后微观形态发生变化。从图 2A 可以看出：未经浸泡的毛竹植硅体呈现棒状，没有弯曲和分叉，表面较为光滑。浸泡 15 d 后的植硅体(图 2B)样品表面变粗糙，出现溶蚀坑；内部硅质颗粒暴露，清晰可见其呈聚集分布。由此认为植硅体并非惰性，其不稳定性从外表面开始被破坏；扫描电镜图像验证了“植硅体有可能不稳定”的结论。

目前对植硅体稳定性的判断还没有统一的评价标准，因此如何寻求有效方式快速了解植硅体的稳定性成为研究者急需解决的问题之一。本研究结果认为：扫描电镜作为一种直观探测方式，可以观测到植硅体表面的微形态变化，可为植硅体稳定性的研究提供依据和辅助判别方法。



A. 浸泡前

B. 浸泡后

图 2 微波消解法提取的植硅体浸泡前后的微观形态变化

Figure 2 Micromorphological changes of the phytolith extracted by microwave digestion method before and after soaking

3 结论

微波消解法是提取毛竹植硅体比较理想的方法,可以观察到植硅体表面的溶蚀坑、破碎、粗糙度等微形态变化特征。对微波消解法提取的毛竹植硅体,经 pH 10 的硼酸缓冲液中浸泡 15 d 后进行扫描电镜观测,能观察到毛竹植硅体在浸泡后的不稳定状态,验证了“植硅体不稳定”的说法。

4 参考文献

- [1] PARR J F, SULLIVAN L A. Soil carbon sequestration in phytoliths [J]. *Soil Biol Biochem*, 2005, **37**(1): 117 – 124.
- [2] 王永吉, 吕厚远. 植物硅酸体研究及应用[M]. 北京: 海洋出版社, 1993.
- [3] STRÖMBERG C A E. Using phytolith assemblages to reconstruct the origin and spread of grass-dominated habitats in the great plains of north America during the late Eocene to early Miocene [J]. *Palaeogeogr Palaeoclimatol*, 2004, **207**(3/4): 239 – 275.
- [4] WILDING L P, BROWN R E, HOLOWAYCHUK N. Accessibility and properties of occluded carbon in biogenetic opal [J]. *Soil Sci*, 1967, **103**(1): 56 – 61.
- [5] 左昕昕, 吕厚远. 我国旱作农业黍、粟植硅体碳封存潜力估算[J]. 科学通报, 2011, **56**(34): 2881 – 2887.
ZUO Xinxin, LÜ Houyuan. Carbon sequestration within millet phytoliths from dry-farming of crops in China [J]. *Chin Sci Bull*, 2011, **56**(34): 2881 – 2887.
- [6] PARR J F, SULLIVAN L A, QUIRK R. Sugarcane phytoliths: encapsulation and sequestration of a long-lived carbon fraction [J]. *Sugar Tech*, 2009, **11**(1): 17 – 21.
- [7] PARR J F, DOLIC V, LANCASTER G, *et al.* A microwave digestion method for the extraction of phytoliths from herbarium specimens [J]. *Rev Palaeobot Palynol*, 2001, **116**(3/4): 203 – 212.
- [8] PARR J, SULLIVAN L, CHEN Bihua, *et al.* Carbon bio-sequestration within the phytoliths of economic bamboo species [J]. *Global Change Biol*, 2010, **16**(10): 2661 – 2667.
- [9] POST W M, KWON K C. Soil carbon sequestration and land-use change: processes and potential [J]. *Global Change Biol*, 2000, **6**(3): 317 – 328.
- [10] FRAYSSE F, POKROVSKY O S, SCHOTT J, *et al.* Surface chemistry and reactivity of plant phytoliths in aqueous solutions [J]. *Chem Geol*, 2009, **258**(3/4): 197 – 206.
- [11] BARTOLI F, WILDING L P. Dissolution of biogenic opal as a function of its physical and chemical properties [J]. *Soil Sci Soc Am J*, 1980, **44**(4): 873 – 878.
- [12] CONLEY D J, LIKENS G E, BUSO D C, *et al.* Deforestation causes increased dissolved silicate losses in the Hubbard Brook Experimental Forest [J]. *Global Change Biol*, 2008, **14**(11): 2548 – 2554.
- [13] 应雨骐, 项婷婷, 李永夫, 等. 中国亚热带重要树种植硅体碳封存潜力估测[J]. 自然资源学报, 2015, **30**(1): 133 – 140.
YING Yuqi, XIANG Tingting, LI Yongfu, *et al.* Estimation of sequestration potential via phytolith carbon by important forest species in subtropical China [J]. *J Nat Resour*, 2015, **30**(1): 133 – 140.
- [14] YANG Jie, WU Jiasen, JIANG Peikun, *et al.* A study of phytolith-occluded carbon stock in monopodial bamboo in China [J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 13292. doi: 10.1038/srep13292.
- [15] 周国模, 姜培坤, 徐秋芳. 竹林生态系统中碳的固定与转化[M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [16] 郭起荣, 杨光耀, 杜天真, 等. 中国竹林的碳素特征[J]. 世界竹藤通讯, 2005, **3**(3): 25 – 28.
GUO Qirong, YANG Guangyao, DU Tianzhen, *et al.* Carbon character of Chinese bamboo forest [J]. *World Bamboo Rattan*, 2005, **3**(3): 25 – 28.
- [17] 曹君迈, 贝盛临, 江涌, 等. 枸杞花蕾扫描电镜制样方法的探讨[J]. 北方园艺, 2010(3): 30 – 32.
CAO Junmai, BEI Zhanlin, JIANG Yong, *et al.* Flower bud of *Lycium barbarum* L. scanning microscopy preparation methods discussed [J]. *Northern Hortic*, 2010(3): 30 – 32.
- [18] 肖媛, 刘伟, 汪艳, 等. 生物样品的扫描电镜制样干燥方法[J]. 实验室研究与探索, 2013, **32**(5): 45 – 53.
XIAO Yuan, LIU Wei, WANG Yan, *et al.* Drying methods of biological sample preparation for scanning electron microscope [J]. *Res Explor Lab*, 2013, **32**(5): 45 – 53.
- [19] 张喆, 胡晶红, 李佳, 等. 扫描电镜在生药研究领域中的应用概况[J]. 中国医药导报, 2013, **10**(30): 24 –

27.

ZHANG Zhe, HU Jinghong, LI Jia, *et al.* Applications of scanning electron microscope in pharmacognosy research [J]. *China Med Herald*, 2013, **10**(30): 24 – 27.

[20] 杨杰, 李永夫, 黄张婷, 等. 碱溶分光光度法测定植硅体碳含量[J]. 分析化学, 2014, **42**(9): 1389 – 1390.

YANG Jie, LI Yongfu, HUANG Zhangting, *et al.* Determination of phytolith-occluded carbon content using alkali dissolution-spectrophotometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2014, **42**(9): 1389 – 1390.

[21] HUANG Zhangting, LI Yongfu, CHANG S X, *et al.* Phytolith-occluded organic carbon in intensively managed Lei bamboo (*Phyllostachys praecox*) stands and implications for carbon sequestration [J]. *Can J For Res*, 2015, **45**(8): 1019 – 1025.

[22] WALKLEY A, BLACK I A. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method [J]. *Soil Sci*, 1934, **37**(1): 29 – 38.

《浙江农林大学学报》2019 年征订启事

《浙江农林大学学报》连续 8 次入选全国中文核心期刊, 荣获第二届国家期刊奖百种重点期刊奖, 首届浙江省优秀科技期刊二等奖, 第二届浙江省优秀科技期刊一等奖, 浙江省精品科技期刊, 首届和第二届全国优秀科技期刊三等奖, 全国高校优秀科技期刊一等奖, 中国高校百佳科技期刊。

《浙江农林大学学报》主要报道林业基础学科、森林培育学、森林经理学、经济林学、林业工程、植物保护学、林木遗传育种、植物学、生态学、动物学、生物技术、环境保护学、园林学和园艺学等学科的学术论文、问题讨论和研究简报等。供农林科技工作者、园林绿化和规划设计人员、环保工作者、大专院校师生、基层干部、农林科技专业户及科技信息人员参阅。双月刊, 大 16 开本, 每期 192 页。国内外公开发行人。ISSN 2095-0756, CN 33-1370/S。所刊文章被国内外 20 多种文摘刊物和数据库收录。附英文目次和英文摘要。

定价: 20.00 元/期, 全年 120.00 元/份。国内订户请向全国非邮发报刊联合发行部订阅, 地址: 300381 天津市大寺泉集北里别墅 17 号。电话: 022-23973378。E-mail: LHZD@public.tpt.tj.cn。也可直接向浙江农林大学学报编辑部汇款订购。邮汇: 311300 浙江省杭州市临安区武肃街 666 号浙江农林大学学报编辑部。电话: 0571-63732749。E-mail: zlxh@zafu.edu.cn。银行汇款: 建行临安支行营业部。账号: 33001617335050018761。户名: 浙江农林大学。

国外读者请向中国出版对外贸易总公司办理订阅手续。地址: 100011 北京 782 信箱。

欢迎订阅, 欢迎投稿。