

龙眼花粉形态扫描电子显微摄影测量的研究

童 文 陞

(福建省测绘局, 福州)

邵 小 华

(福建省农业科学院果树研究所, 福州)

摘 要

本文利用扫描电子显微技术、电子计算机计算技术和摄影测量学原理,对龙眼花粉进行三维定量分析。使孢粉形态学的研究从光学显微镜(OLM)、透射电子显微镜(TEM)、扫描电子显微镜(SEM)进入到扫描电子显微摄影测量(SEMP)立体观察与三维定量分析的高级阶段。为我国龙眼一个野生品种和五个栽培品种进行了形态分类,为改良品种和遗传变异的研究提供了分析数据。

关键词: 龙眼花粉,扫描电子显微摄影测量,极性花粉,萌发孔

SEM 的出现,以其出色的分辨力,将微观世界通过扫描显微图象^[1]逼真地展示在我们面前。用摄影测量学原理^[2-6],获得的扫描电子显微立体象对(图 1),用立体镜观察,不但能使微形结构与超微结构表面凸凹不平的形态更为鲜明、真实、立体化,而且能使 SEM 图象信息更加深入广阔。

试验测定了龙眼花粉的高程;两轴长度、比值、形状;花粉粒表面积、体积;沟界极区直径、孔穴密度、垅脊宽度;两面观等值线图;花粉萌发孔定量分析数据:花粉粒和外壁纹饰剖面图。

一、材料与方法

1. 研究材料

研究材料系无患子科(*Sapindaceae*)龙眼属(*Dimocarpus Longan*)龙眼种(*Lamgan Variety*)的一个野生品种(广东海南野营 2 号)和 5 个栽培品种(我国广东石硖、广西大乌眼、福建福眼、油潭本和泰国苗翘(又名诗签甫))。

试验材料用 G. Erdtman 醋酸酐分解法^[2]对龙眼花粉进行处理,在 IB-5 型离子溅射镀膜机上制成样品。

2. 获取立体图象

在日本电子公司(JEDL LTD)生产的 JSM-35CF 扫描电子显微镜上,根据摄影测量

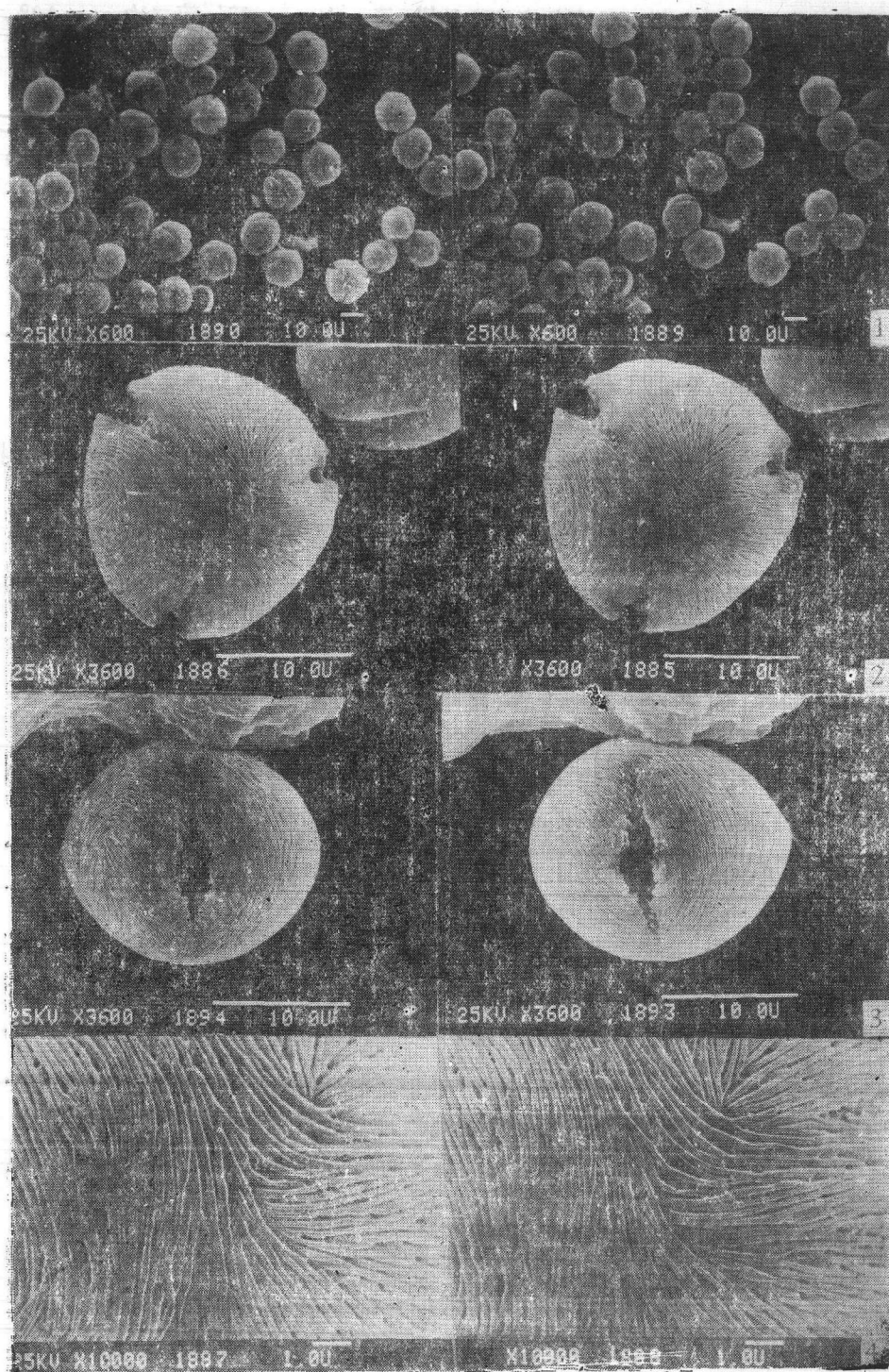


图1 龙眼(苗翹品种)花粉扫描显微立体象对
(1—群体, 2—板面观, 3—赤道面观, 4—外壁纹饰)

学视差原理用改变样品对入射电子束角度的方法^[3], 第一次 $\alpha_1 = 0^\circ$, 第二次 $\alpha_2 = 10^\circ$, 对样品做两次放大扫描, 扫描与摄影同步。

表 1 扫描量测绘图放大倍率

形 体	扫描倍率	量测倍率	绘图倍率
群 体	360	360	
个 体	2000	2000	5200
纹 饰	5500	5500	13000

利用 $\alpha_1 = 0^\circ$ 和 $\alpha_2 = 10^\circ$ 的同名扫描显微象片对, 即可构成立体象对。

3. 模型量测

JSM-35CF SEM 的分辨力为 $60 \text{ \AA}$, 扫描图象分解力 (R_O) 为 600 线/mm, 摄影扫描成象的底片分解力 $R_N \geq 70$ 线/mm^[7]。据此按下列公式:

$$R = \sqrt{\frac{R_O^2 \cdot R_N^2}{R_O^2 + R_N^2}}$$

$$L_x = \frac{1}{R}$$

$$\delta_h = \frac{(1 - \cos Q)}{\sin Q}$$

算出综合分解力 (R)^[8], 最小量测单元 (L_x) 和 L_x 相应之高程最小值 (δ_h) (表 2)。

表 2 分解力与最小量测值

$R \cdot L_x \cdot \delta_h$	数 值
R_O	600 线/mm
R_N	70 线/mm
R	70 线/mm
L_x	$14 \mu\text{m}$
δ_h	$13 \mu\text{m}$
要求的观测仪器精度	$14 \mu\text{m}$

试验用 HCZ-1 型 1818 立体坐标量测仪观测, 该仪器放大倍率 8 倍; X 最小刻度值 0.02mm; P 最小刻度值 0.005mm; 仪器观测精度约为 0.007mm, 与理论上最小量测单元 L 相应。

4. 数学模型

$$h = \frac{d_2 - d_1 \cos Q}{\sin Q \cdot K} \quad (\text{高程})^{[2]},$$

$$\overline{EAD} = \sqrt{\frac{(X_{E_2} - X_{E_1})^2 + (Y_{E_2} - Y_{E_1})^2}{K}} \quad (\text{赤道轴距}),$$

$$\overline{PAD} = \sqrt{\frac{(X_{P_2} - X_{P_1})^2 + (Y_{P_2} - Y_{P_1})^2}{K}} \quad (\text{极轴距}),$$

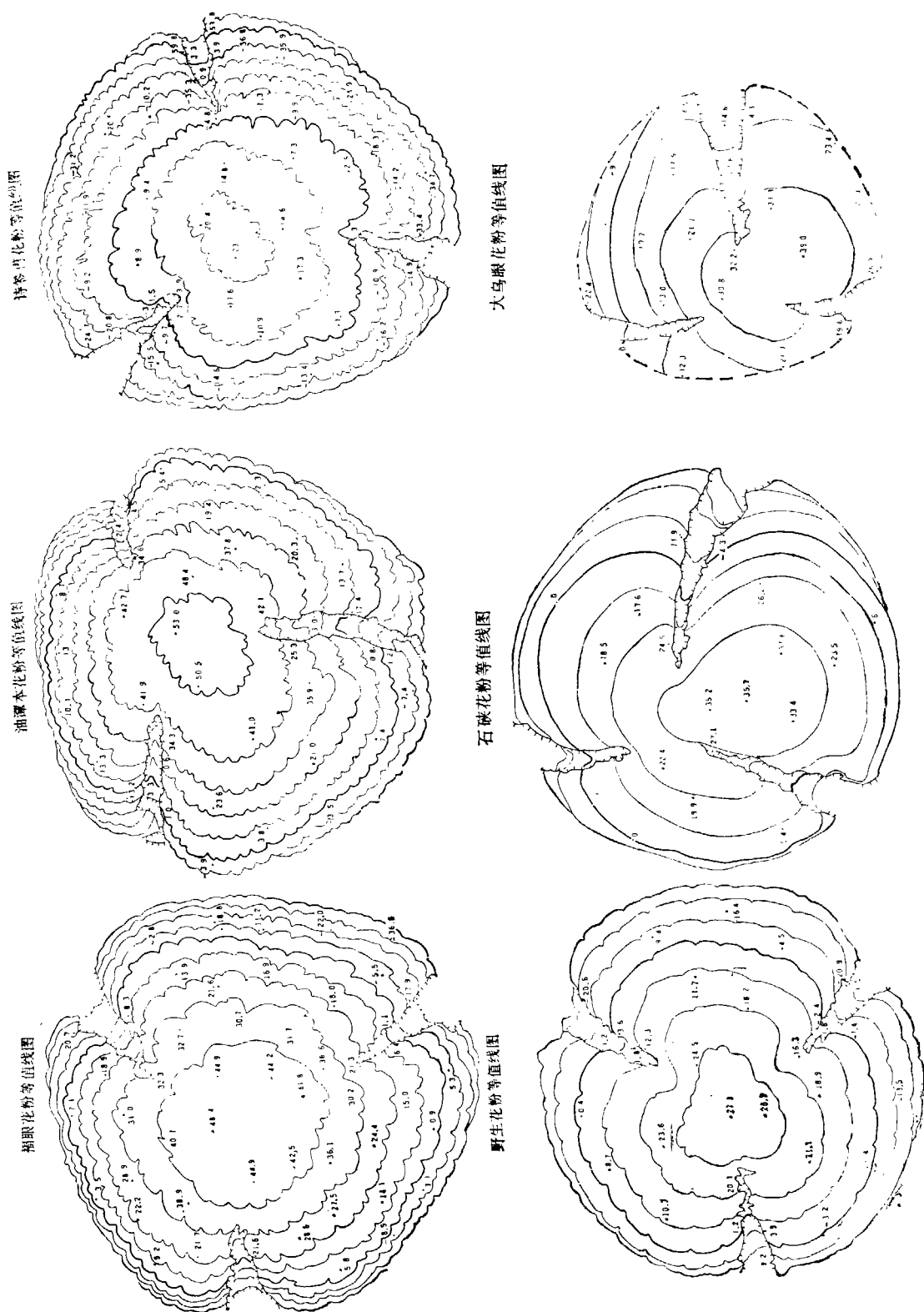


图 2(a) 龙眼花粉板面观等值线图

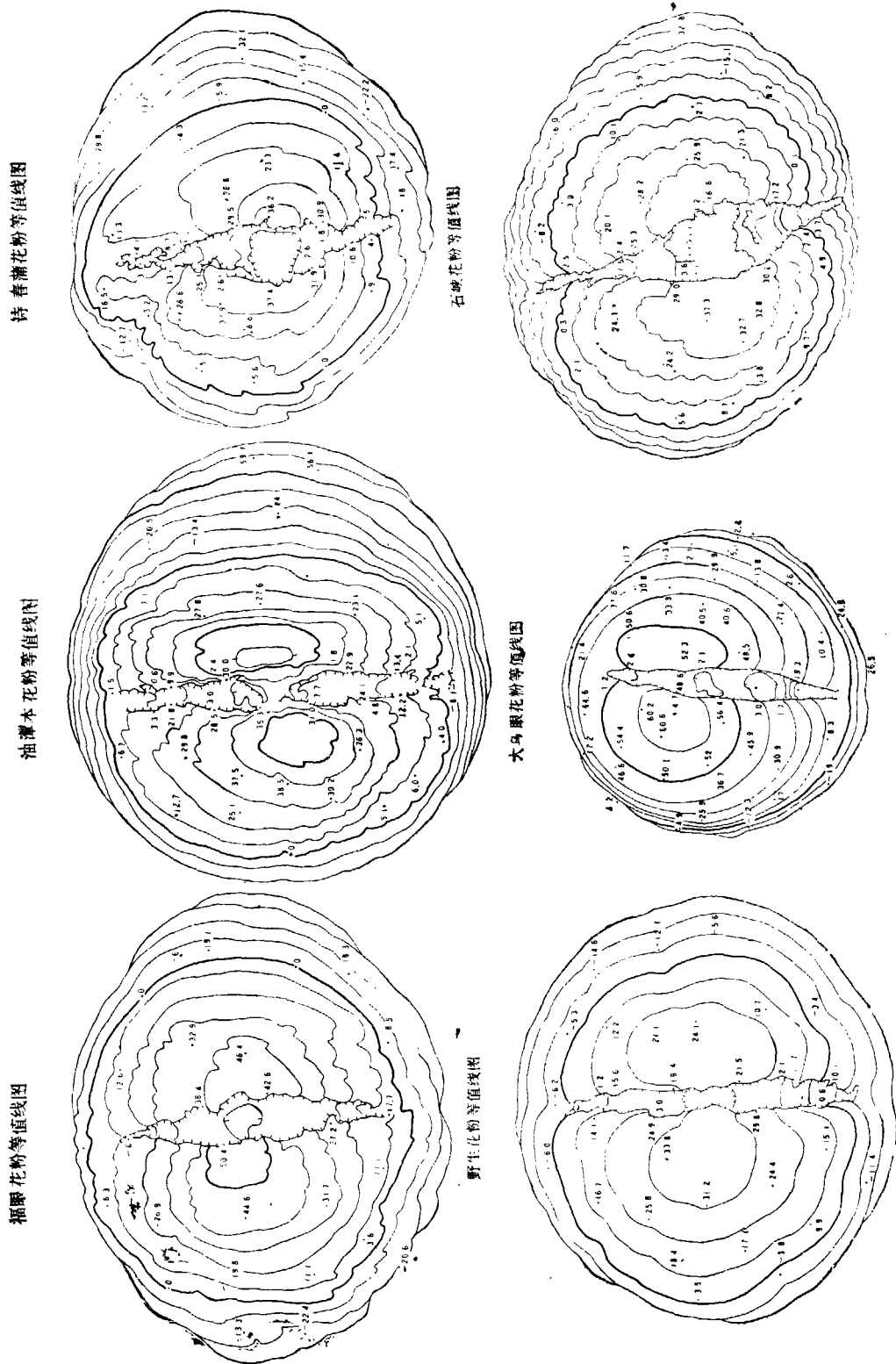


图 2(b) 龙眼花粉赤道面观等值线图

$$\Delta h = \frac{\Delta P}{\sin Q} \quad (\text{高差}),$$

$$S \cong \frac{1}{K^2} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m \sqrt{(L_{i,j} \cdot \delta_{i,j})^2 + (L_i \cdot H \cdot K)^2} \quad (\text{表面积})^{[2,13]}.$$

$$V \cong \frac{H}{2K} (F_{n+1} - F_1) + \frac{H \sum_{i=1}^n F_i}{K} \quad (\text{体积}),$$

$$D_0 = \frac{D}{K} \quad (\text{沟界极区直径}),$$

$$T = \frac{N}{S} \quad (\text{孔穴密度}).$$

在含有极性的花粉中,可以分为等级的(Isolar)、亚等级(Subisopolar)和异极(Heteropolar) 3 个类型,除极少数花粉不对称外,大多数花粉对称,龙眼属于极性花粉,据此特性,两倍赤道面或极面以上可见部分的表面积和体积即为花粉 S 与 V 的全值。

5. 精度估算

根据最小二乘法原理,按误差传播定律,精度按下列公式估算:

$$m_h' = \frac{m_a^2(1 + \cos^2 Q)}{\sin^2 Q \cdot K^2} + \frac{1}{K^2 \cdot \rho^2} \left(d_i^2 \cdot \sin^2 Q \cdot m_D^2 + \frac{d_i^2 \cdot m_Q^2}{\sin^2 Q} \right),$$

$$m_{\Delta h} = \pm \sqrt{2} \cdot m_h,$$

$$m_S' = \frac{1}{K^3} \cdot \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m \frac{(L_{i,j} \cdot \delta_{i,j})^2 (\delta_{i,j}^2 \cdot m L_{i,j}^2 + L_{i,j}^2 \cdot m \delta_{i,j}^2) + (m_L \cdot L_i)^2 (H \cdot K)^4}{(L_{i,j} \cdot \delta_{i,j})^2 + (L_i \cdot H \cdot K)^2},$$

$$m_V' = H^2 \cdot m_F^2 \left(n + \frac{1}{2} \right) + \left(\frac{2}{3K^2} \pi \cdot R \cdot m_R \right)^2 + \left(\frac{1}{3K^2} \pi \cdot R^2 m_H \right)^2,$$

$$m_{EAD} = m_{PAD} = \pm \frac{1}{K} m_{\Delta X}, \quad m_{el} = \pm \sqrt{\left(0.25 + \frac{69.2}{K} \right)^2 + 0.25'}.$$

表 3 精度估算值

m	中 误 差 数 值			
m_h	$K = 2000$	$\pm 0.23 \mu\text{m}$	$K = 3000$	$\pm 0.15 \mu\text{m}$
$m_{\Delta h}$		$\pm 0.27 \mu\text{m}$		$\pm 0.17 \mu\text{m}$
m_s	$\pm 1 \times 10^{-3} \text{mm}^2$			
m_V	$\pm 1.3 \times 10^{-5} \text{---} \pm 11.3 \times 10^{-5} \text{mm}^3$			
m_{EAD}	$K = 300$ 时		$m_{EAD} = \pm 0.17 \mu\text{m}$	
m_{el}	$K = 3000$ 时		$m_{el} = \pm 0.37 \mu\text{m}$	

式中:

$$m_d = \pm \sqrt{2} \cdot m_x \approx \pm 0.04 \text{mm}, \quad m_Q = \pm 15',$$

$$Q = 10^{\circ}, \quad \rho'' = 602265, \quad m_L = m_{L_i} = m_{L_{i,j}} = m_{\theta_{i,j}} = \pm 1\text{mm},$$

$$m_F = \pm 1 \times 10^{-3}\text{mm}^2, \quad m_r = \pm 1\text{mm}, \quad m_{\Delta h} = \pm 1\mu\text{m},$$

并令 $d_1 = d_2 = 40\text{mm}$.

二、研究结果与分析

1. 龙眼花粉粒大小

SEMP 除用两轴长度表示花粉粒大小, 还增加了花粉粒表面积和体积(表 4). 从大小上看, 福眼、油潭本、苗翘的表面积和体积最大, 可以划分为一个类型; 其余 3 个品种由于选择关系, 大小上没有呈现出一个稳定的规律.

2. 花粉粒形状与两面观分析

根据两极距比值, 对照 G. Erdtman 分类原则^[1], 从形状上看, 基本上可以划分为两个类型, 大乌眼圆球形占多数, 其余 5 个品种, 多数是近扁球形.

SEMP 两面观等值线图(图 2) 是一种用高程、符号和等值线刻画花粉粒形状的三维线划图, 在等值线图上可以量取各种数据(表 5), 计算任意两点间高差, 描绘花粉粒剖面(图 3), 比较各花粉粒之间的形态差异, 分析三沟尾形状的特征.

表 4 龙眼花粉粒大小和形状*

品种 \ 项目	极 轴 μm	赤道轴 μm	比值	表面积 mm^2	体 积 mm^3	花 粉 形 状**						
						A	B	C	D	E	F	G
野营二号	15.26 12.41—17.97	17.73 15.13—20.40	86	7.79×10^{-4}	9.28×10^{-5}	0	0	0	7	10	3	0
石 硖	14.35 10.96—16.00	16.99 13.41—19.49	82	8.80×10^{-4}	10.2×10^{-5}	0	0	1	5	13	1	0
大 乌 眼	14.73 12.90—17.10	16.56 15.05—18.38	89	8.08×10^{-4}	9.7×10^{-5}	0	0	0	12	7	1	0
福 眼	16.23 13.12—18.91	18.73 18.06—22.46	87	12.18×10^{-4}	16.8×10^{-5}	0	0	0	2	14	4	0
油 潭 本	15.76 13.36—18.12	19.51 16.80—21.99	81	10.39×10^{-4}	11.4×10^{-5}	1	0	0	3	11	5	0
苗 翘	14.87 12.89—17.40	16.79 14.08—18.40	88	10.77×10^{-4}	12.1×10^{-5}	0	0	0	9	9	0	2

* 根据 G. Erdtman 1952 年花粉形状分类标准.

** A——超长球形, B——长球形, C——近长球形, D——圆球形, E——近扁球形, F——扁球形, G——超扁球形.

从花粉粒剖面图形看, 福眼、油潭本、苗翘图形相似属一个类型; 野营二号、石硖属一个类型; 大乌眼为另一个类型.

3. 花粉萌发孔

根据萌发孔沟的长、宽、深(表 6) 和赤道面观等值线图, 反映了萌发孔的数量特值和外部形态——福眼、石硖、苗翘为菱形, 中部宽度大约是赤道轴长度的 $1/6—1/8$; 野营二号、大乌眼、油潭本为长条形, 中部宽度大约是赤道轴长度的 $1/8—1/10$.

野营二号、石硖萌发沟的两末端封闭; 油潭本、苗翘萌发沟的两末端开裂; 福眼和大乌眼一端开裂, 一端封闭.

表5 SEM, SEMP 两面观比较和 SEMP 的 Δh 和 h_s 值* (单位 $0.1\mu\text{m}$)

品 种	方 法 项 目	SFM		SEMP									
		极面观	赤道面观	极 面 观						等值线图形特点		三沟尾	
				Δh			h_s			极 面 观	赤道面观		
				h_a	h_b	h_c	a	b	c				
野营二号	钝三角形	椭圆形	3.1	10.8	15.8	89	98	89	1.曲线圆滑少弯曲 2.坡度均为 45°	曲线顺着不明显 的垅脊延伸	等腰 Δ		
石 硖	钝三角形	椭圆形	5.7	7.2	18.7	32	37	44			任意 Δ		
大乌眼	钝三角形	圆 形	6.8	7.0	15.0	49	45	51	坡度 39°	曲线顺着萌发沟 方向延伸	近似等腰 Δ		
福 眼	钝三角形	宽椭圆形	16.1	16.4	27.1	96	114	114	1.曲线与纹饰垅 脊近于直交 2.垅间沟呈小v 字形, 3.坡度近似相等 约为 48°	曲线顺着垅脊延 伸	等腰 Δ		
油潭本	钝三角形	圆 形	11.5	15.0	21.2	98	98	86			近似等腰 Δ		
苗 翘	钝三角形	椭圆形	16.0	33.0	33.0	126	126	126			等边 Δ		

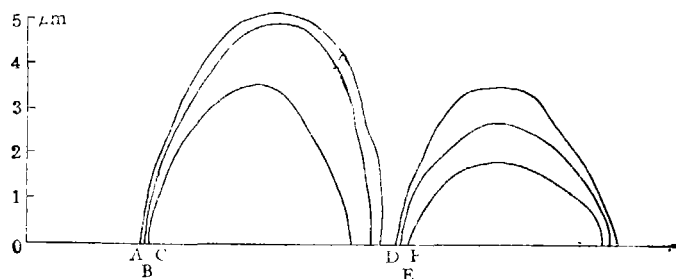
* Δh ——极顶至萌发沟尾端高差, h_s ——三沟尾端距。

图3 6个龙眼品种花粉粒剖面图

(A——苗翘, B——油潭本, C——福眼,
D——野营二号, E——石硖, F——大乌眼)

4. 外壁纹饰

花粉外壁纹饰具有遗传性,一定属和一定种的纹饰有它相对的稳定性,是孢粉形态学分类的一个重要依据。

表6 花粉萌发沟长、宽、深

(单位 μm)

品 种	项 目	萌发沟类型	长 度	宽 度 深 度				沟 形
				中 部		尾 部		
				宽 度	深 度	宽 度	深 度	
野营 2 号		三孔沟不具合沟	19.3	1.3	0.3	0.4	0.05	两末端封闭
石 硖		同 上	20.8	4.5	0.36	0.6	0.25	同上
大 乌 眼		同 上	14.3	2.0	0.21	0.4	0.12	一末端封闭
福 眼		同 上	11.9	1.6	0.41	0.4	0.13	一末端开裂
油 潭 本		同 上	14.0	1.5	0.77	0.8	0.21	末端开裂
苗 翅		同 上	12.8	2.6	0.26	0.3	0.14	

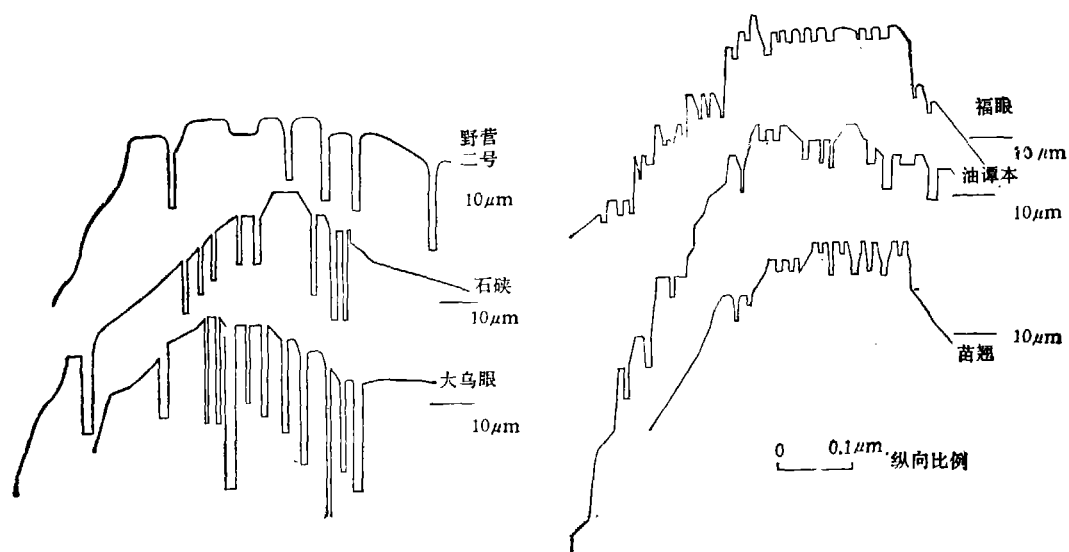


图 4 龙眼花粉外壁纹饰剖面图

从极面观立体观察,福眼、油潭本、苗翘的纹饰属明显的长条状垅脊形,连续性强,过极端的垅脊一直延伸到赤道处,近赤道处垅脊呈V字形交接,垅间凹地呈长条形,时有穿孔凹坑,深度约 $0.4\mu\text{m}$,垅脊最大宽度 $0.4\mu\text{m}$,最小 $0.04\mu\text{m}$,沟界极区穿孔密度,福眼品种最大,30.8个/ μm^2 ,其次是油潭本18.8个/ μm^2 ;从赤道面观看,长条垅脊顺着萌发沟方向。上述3个品种外壁纹饰剖面图形相似(图4),垅脊宽度和深度基本一致,可达 $0.4\mu\text{m}$ 。

表 7 OLM, SEM, SEMP 外壁纹饰观察比较和 SEMP 量测值

(单位 μm)

品 种	OLM	SEM	S E M P											纹 饰 剖 面 图	
			SEMP	测 定 数 据*											
				D_0	$S_{\mu m^2}$	N	T	$r_{小}$	$r_{大}$	$r_{深}$	$d_{小}$	$d_{大}$	$d_{深}$		
野营二号	纹饰模糊	具不明显的 条纹	具不明显的 条状垅脊	6.9	10.8	193	12.9	0.04	0.20	0.6	0.1	0.7	0.4	3—1	
石 硖	同上	同上	同上	4.6	7.2	105	14.6	0.04	0.20	0.3 ~ 0.6	0.1	0.1	0.6	3—2	
大乌眼	同上	具有条纹	具条状垅 脊	5.9	9.1	152	16.7	0.05	0.20	0.2	0.1	0.3	0.4	3—3	
福 眼	同上	同上	具明显条 状垅脊	10.2	16.0	494	30.8	0.06	0.30	0.4	0.2	0.4	0.4	3—4	
油潭本	同上	同上	同上	7.5	11.8	222	18.8	0.04	0.20	0.4	0.4	0.4	0.4	3—5	
苗 翘	同上	同上	同上	9.5	14.9	151	10.1	0.06	0.20	0.4	0.1	0.4	0.4	3—6	

* D_0 为沟界极区直径, S 为沟界极区面积, N 为孔穴个数, T 为沟界极区穿孔密度, $r_{\text{小}}$ 、 $r_{\text{大}}$ 为孔穴最小、最大直径, $r_{\text{深}}$ 为孔穴深度, $d_{\text{小}}$ 、 $d_{\text{大}}$ 为垅脊最小、最大宽度, $d_{\text{深}}$ 为垅脊深度。

野营二号、石硖外壁纹饰具有不明显的条状疣脊, 最小宽度 $0.1\mu\text{m}$, 沟界极区穿孔密度分别为 12.9 个/ μm^2 和 14.6 个/ μm^2 , 野营二号纹饰孔穴深度 $0.6\mu\text{m}$, 穴距较远, 坡面开阔; 石硖无明显条状凹坑, 穿孔明显, 穴深 $0.3-0.6\mu\text{m}$ 。

大乌眼系条状疣脊, 连续性差, 疣脊最大宽度 $1.5\mu\text{m}$, 最小 $0.1\mu\text{m}$, 沟界极区穿孔密度 16.7 个/ μm^2 , 疣脊深 $0.7\mu\text{m}$ (表 7)。

三、结 论

1. 用 SEMP 法不仅测定了花粉粒两轴长度, 比值, 而且量测计算了花粉粒表面积和体积; 用两面观等值线图表示花粉粒形状; 用大量数据和剖面图反映外壁纹饰特征和萌发孔形状, 从而丰富了孢粉形态学定量分析内容, 使在原有研究水平基础上提高了一步。

2. 根据 SEMP 所提供的花粉粒大小、形状、萌发孔、外壁纹饰、两面观等值线图、剖面图、立体象对以及大量的定量数据, 进行综合分析, 6 个品种的龙眼花粉可以分为 3 个类型: 一类是野营二号、石硖两个品种; 一类是福眼、油潭本、苗翘 3 个品种; 大乌眼品种在上述两类之间。

3. 试验虽以龙眼花粉为试验材料, 但此方法同样适用于其它果树和不同属种植物的花粉形态研究, 因而该方法具有普遍意义。

4. 研究花粉的外部形态和进行定量分析是 SEMP 的技术优势, 但是作为花粉研究的全部内容还必须包括外壁纹饰的层次和沟孔的内部结构, 对于后者, 还必须结合光学显微镜或者是透射电子显微镜共同补充。

龙眼花粉的采集工作由果树研究所柯冠武同志完成; 龙眼花粉电子扫描工作由电子显微镜室黄进华同志完成; 龙眼花粉的量测工作主要由省测绘局内业大队航测队程超群同志完成; 等值线图的测绘由张志君、高平同志完成。在此一并表示谢意。

参 考 文 献

- [1] 田中敬一·永谷隆, 图解扫描电子显微镜——生物样品制备, 科学出版社, 1984, 1—4.
- [2] 王之卓, 摄影测量原理, 测绘出版社, 1979, 339—340.
- [3] MoLhotra, R. C., *Photogrammetric Treatment of Scanning Electron Microscope (SEM) Imagry*, Proceedings of the ASP, 1973, oct, Part I, 481.
- [4] H. M. 卡拉拉主编, 非地形摄影测量——美国《摄影测量手册》节选之六, 测绘出版社, 1985, 146—151.
- [5] 卡尔·林纳, 鲁多夫·布尔哈特, 摄影测量学第二册, 约尔旦/埃格特/克奈斯尔, 测量全书, 第 IIIa 卷, 测绘出版社, 1985, 418—422.
- [6] 冯文灏, 非地形摄影测量, 武汉测绘学院, 1983, 110—113.
- [7] 国家测绘局制定, 1:5 千、1:1 万比例尺地形图航空摄影测量内业规范, 测绘出版社, 1983.
- [8] 顾云芬, 应用 1:9 千—1:1.5 万比例尺航摄资料测制 1:1 千比例尺地形图的研究试验——第一阶段成果报告, 六, 测绘技术, 1980.
- [9] 华罗庚、王元, 数值积分及其应用, 北京 1963 年第二版, 科学出版社.
- [10] 李长明, 在等高线地形图上量算表面积各种方法的分析、比较和改进, 武汉测绘学院学报, 1980 年, 第二期.
- [11] 中国科学院植物研究所等, 中国热带、亚热带被子植物花粉形态, 科学出版社, 1982, 2—8.