

·研究论文·

DOI: 10.16605/j.cnki.1007-7847.2020.04.006

不同扫描电镜制样方法观察棉花叶片气孔

刘 恺¹, 密玲煜¹, 刘玲玲², 李 洋^{1*}

(1. 河南大学 植物逆境生物学重点实验室/棉花生物学重点实验室, 中国河南 开封 475004; 2. 开封市求实高中, 中国河南 开封 475004)

摘 要: 扫描电子显微镜是研究棉花气孔发育及形态建成的重要手段。为了分析常规扫描电子显微镜、环境扫描电子显微镜、冷冻扫描电子显微镜、涂撕法扫描电子显微镜4种方法在棉花气孔观察应用上的优劣, 本文通过对棉花叶片取材、制样、镜检, 横向对比了这4种方法的取样方式、制样时间和镜检结果。结果表明: 常规扫描电子显微镜生物制样时间最长, 样品有一定的失水, 图片衬度效果最好; 环境扫描电子显微镜制样时间最短, 样品失水严重, 图片衬度较差, 样品形态与常规扫描电子显微镜生物制样方法所观察到的形态一致; 冷冻扫描电子显微镜制样时间较长, 样品未发现失水, 图片衬度较差; 涂撕法扫描电子显微镜制样时间较短, 样品未发现失水, 图片衬度较好, 但相对于冷冻扫描电子显微镜制样方法而言, 其样品呈现出反向的形态, 同时由于尖端放电, 荷电较多。本研究分析了不同的扫描电子显微镜制样方法适合得到怎样的棉花气孔图片数据, 为棉花抗旱相关的基础和应用研究提供了一定的参考。

关键词: 棉花; 气孔; 扫描电子显微镜(SEM); 样品制备

中图分类号: Q94-3, Q942

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2020)04-0293-08

Different SEM Sample Preparation Methods to Observe the Stomata of Cotton Leaves

LIU Kai¹, MI Ling-yu¹, LIU Ling-ling², LI Yang^{1*}

(1. Institute of Plant Stress Biology/State Key Laboratory of Cotton Biology, Henan University, Kaifeng 475004, Henan, China;

2. Qiu-shi High School, Kaifeng 475004, Henan, China)

Abstract: Scanning electron microscope (SEM) is an important way to study the development and morphogenesis of cotton stomata. Herein, advantages and disadvantages in cotton pore observation with SEM, environmental scanning electron microscope (ESEM), cryo-SEM, and print-SEM were analyzed by comparing horizontally their sampling methods, including the sample collection, preparation time and microscopy results. SEM proved to have the longest sample preparation time, some water loss in samples, but the best image contrast. ESEM took the shortest time to make samples, but had serious water loss in samples and poor image contrast. The morphology of the samples was consistent with that observed by the SEM biological sampling method. Cryo-SEM took a long time to prepare samples, and there was no water loss in the samples, but poor image contrast. The sample preparation time for print-SEM was short, with no water loss and a better image contrast and the sample presented the morphology of the reverse cryo-SEM, but the charge was more due to the tip discharge. This study revealed what kind of stomatal image data could be obtained by different SEM sampling methods, and may provide some references for research on drought-resistant basis and application of cotton.

Key words: cotton; stomata; scanning electron microscope (SEM); sample preparation

(*Life Science Research*, 2020, 24(4): 293~300)

收稿日期: 2019-11-05; 修回日期: 2020-01-08

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(3100202)

作者简介: 刘恺(1990—), 男, 河南开封人, 硕士, 助理实验师; 刘恺和密玲煜对本文的贡献相同, 为本文共同第一作者; *通信作者: 李洋(1987—), 男, 河南濮阳人, 硕士, 助理实验师, 主要从事植物电子显微镜技术研究, Tel: 0371-23866063, E-mail: lyaiwojia@163.com。

棉花是最主要的经济作物之一,与国民生活密切联系,影响着经济的发展,是我国很重要的一种战略储备^[1]。棉花的主要产地大部分位于干旱和半干旱地区,而干旱特别是棉花蕾期的干旱影响着棉花的单株产量和纤维长度^[2],是制约棉花生产的重要因素^[3]。使用扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察气孔形态,是研究棉花抗旱机理的重要手段^[4]。

SEM的成像原理是细聚焦电子术轰击待测样品,入射电子与样品弱束缚价电子产生非弹性散射电子(也称为二次电子,二次电子的产生额与电子术和样品的入射角正相关),通过电子术在样品表面小片区域内逐点扫描,并逐点收集产生的二次电子信号,便可放大并还原出样品的表面形貌^[5]。因为电子术的穿透能力很差,所以SEM的腔室在测试期间需要保持真空状态。为了避免样品在真空环境下失水而发生形变,镜检样品必须保持干燥^[6]。电子术轰击样品后,如果无法及时导出就会聚集在样品表面,聚集的电子同样形成二次电子信号,造成镜检的局部高亮,影响样品形貌的观察,这种现象叫做荷电。荷电现象要求镜检样品必须导电。大部分生物材料在使用常规的SEM进行镜检观察时,都需要一系列繁琐的制样步骤来使其满足这两个条件。而繁琐的制样过程不可避免地会破坏样品表面的细节^[7],因此人们希望通过更新SEM技术简化观察含水样品的步骤,以探求生物样品最真实的形貌。随着科技的发展,环境扫描电子显微镜(environmental scanning electron microscope, ESEM)^[8]和冷冻扫描电子显微镜(cryo-SEM)先后产生。ESEM借助多级压差光阑技术,在确保电子枪室处于高真空的同时,以水蒸气或者氮气为媒介,使样品室处于相对低的真空,通过半导体降温的方式,降低样品台温度,减缓含水样品的水分散失^[9];同时,利用气体二次电子探头技术,减少气体二次电子对样品二次电子的干扰,并减弱样品荷电的产生,使得含水样品得以直接观察^[10]。Cryo-SEM借助固态氮气超低温(-196℃)冷冻技术,使得样品中的水形成玻璃态的冰,以减少液体冷冻聚集,从而不影响样品表面形貌^[11];同时,利用冷冻传输技术,使样品从超低温冷冻制样到电镜观察一直保持低温状态,避免其在高真空中失水,从而做到对含水样品在冷冻状态下的快速电镜观察^[12]。此外,本实验室借鉴光学显微镜涂撕法观察植物表皮的方法^[13],

开发了将指甲油涂抹在样品表面,撕取表面所形成的指甲油膜进行SEM观察的方法(print-SEM),其用印染的相代替含水样品来观察样品表面形貌^[14]。

本文分别采用上述4种不同方法,对棉花叶片的气孔进行SEM观察,以探究这4种方法在棉花气孔研究方面的优缺点,从而为棉花抗旱相关的基础和应用研究提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所使用的棉花叶片取自陆地棉(*Gossypium hirsutum*)野生型植株,叶龄为25 d。实验材料种植于温室中,由棉花生物学国家重点实验室(河南大学)提供。

1.2 仪器和试剂

本研究所使用的扫描电子显微镜型号为QUANTA 250 (FEI公司,美国),该电镜为环境扫描电子显微镜,能进行高真空扫描、低真空扫描和环境扫描3种模式的电镜观察。另外,该电镜加装有型号为Alto 1000的冷冻传输装置(GATAN公司,美国),可以进行冷冻扫描电镜观察。其他主要仪器设备有型号为MSP-2S的真空离子溅射仪(IXRF公司,日本)和型号为K850的CO₂临界点干燥仪(EMITECH公司,英国)。

实验中使用的试剂主要包括:25%戊二醛(电子显微镜级,SPI公司,美国);一水磷酸二氢钠(NaH₂PO₄·H₂O,分析纯级,上海生工生物工程股份有限公司);十二水磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O,分析纯级,上海生工生物工程股份有限公司);无水乙醇(分析纯级,国药集团化学试剂有限公司);冷冻包埋剂(樱花公司,美国)。

1.3 常规扫描电镜制样方法及观察

裁取2 mm×2 mm的棉花叶片组织块,放入4℃预冷的戊二醛固定液(体积分数2.5%,由0.1 mol/L pH 7.1的磷酸缓冲液配制),抽真空约1 h,直至叶片沉入固定液中。4℃固定12 h以上,最长不可超过4 d。磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.1)清洗2次,每次15 min;30%、40%、50%、70%、90%、100%乙醇各15 min梯度脱水。脱水样品经CO₂临界点干燥后用真空离子溅射仪喷镀15 s,最后在电镜高真空模式下选择电压25 kV spot 3观察成像(图1A)。

1.4 环境扫描电镜制样和观察

裁取5 mm×5 mm的棉花叶片组织块,放入

ESEM 中,在电镜样品室压强 500 Pa、环境真空模式下选择电压 25 kV spot 4 观察成像(图 1B)。

1.5 冷冻扫描电镜制样和观察

裁取 2 mm×2 mm 的棉花叶片组织块,用少量冷冻包埋剂将其固定于样品杆上,经液氮速冻后用电镜检测样品表面的冰晶量,并于 95 °C 升华除冰 5 min,然后再用电镜检测样品表面的冰晶量,如果表面仍有冰晶,再次升华除冰,直至消除样品表面所有冰晶。除冰后的样品先用真空离子溅射仪喷镀 90 s,随后在电镜高真空模式下选择电压 5 kV spot 4 观察成像(图 1C)。

1.6 涂撕法扫描电镜制样和观察

取棉花叶片,将指甲油均匀涂抹在要观察区域的表面(不要反复涂抹以免损伤表面特征),5 min 自然干燥后撕取指甲油印模,并裁取 5 mm×5 mm 的样品块。采用真空离子溅射仪喷镀 15 s 后,在电镜高真空模式下选择电压 25 kV spot 3 观察成像(图 1D)。

1.7 数据处理

气孔开度数据通过 ImageJ 软件测量获得,以

平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析;显著性水平为 $P<0.05$ 具有统计学意义。柱状图通过 Origin 8.0 软件绘制。

2 结果

2.1 实验取材对比

固定步骤的固定速率也称作固定溶液渗透速率,其限制着生物材料样品制备的大小。由于常规 SEM 制样和 cryo-SEM 制样都有固定这一步骤,不同的是前者采用的是戊二醛化学固定法,后者采用的是液氮速冻法,所以我们在这两种制样方法中的取材大小均选择了 2 mm×2 mm。在采用 ESEM 观察生物样品期间,样品仍会缓慢失水,所以样品的取材应尽可能大,以减缓样品中心区域的失水速度,提高对样品中心区域观察的效果,因此本实验针对该方法选择了 5 mm×5 mm 的样品尺寸。而 print-SEM 由于不涉及到固定和失水,所以也同样选择了 5 mm×5 mm 的样品尺寸,以获得更大的观察范围。从取样难度比较,print-SEM 实验最难,cryo-SEM 实验较难,常规

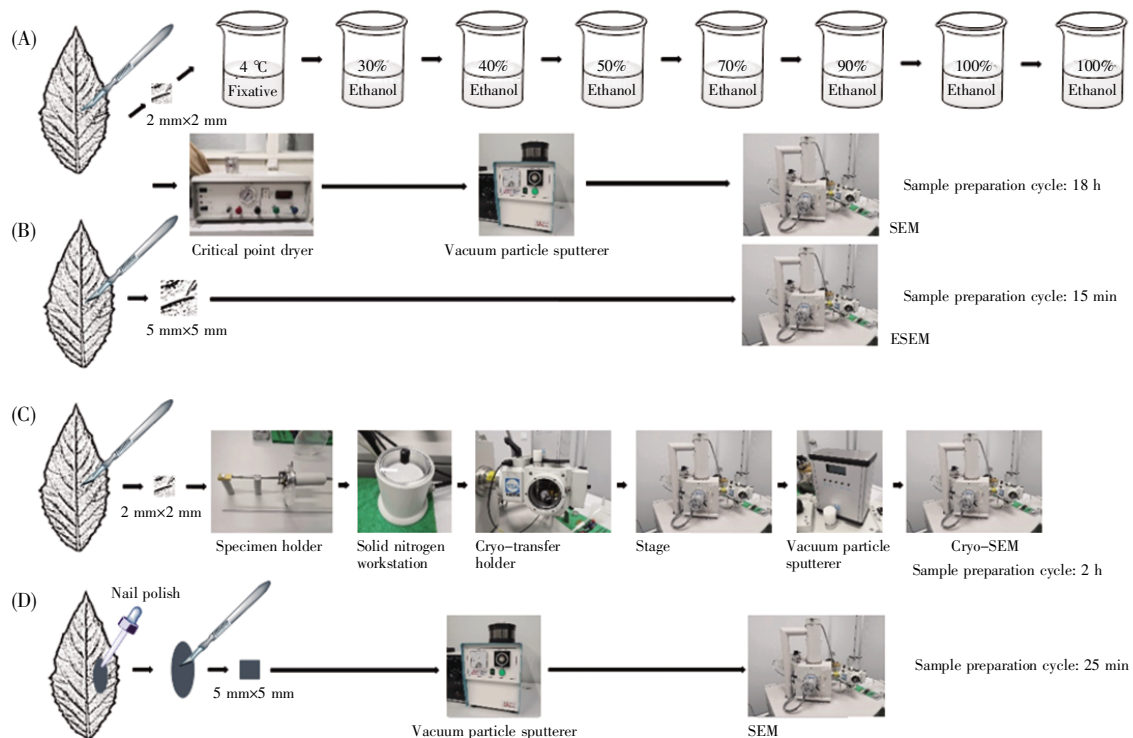


图 1 制样方法的简易流程

(A) 常规扫描电镜制样观察棉花叶片; (B) 环境扫描电镜观察棉花叶片; (C) 冷冻扫描电镜观察棉花叶片; (D) 涂撕法扫描电镜观察棉花叶片。

Fig.1 Simple process of sample preparation methods

(A) Regular SEM sample observation of cotton leaves; (B) ESEM observation of cotton leaves; (C) Cryo-SEM observation of cotton leaves; (D) SEM with a tearing sample preparation in observation of cotton leaves.

SEM 制样实验较简单, ESEM 实验最简单。实验取材过程的具体对比情况如表 1 所示。

2.2 实验周期及实验繁琐程度对比

采用常规的 SEM 观察生物样品时其实验步骤包括: 取材、固定、脱水、干燥、喷镀、电镜观察, 为了使样品获得更好的固定效果, 一般选择过夜 (12 h) 固定。在本研究中我们选择 30%、40%、50%、70%、90%、100%、100% 乙醇对样品进行梯度脱水处理, 每步 15 min; 样品干燥采取的是 CO₂ 临界点干燥, 干燥过程耗时 2 h。总的来讲, 常规 SEM 制样整体耗时约 18 h (图 1A)。采用 ESEM 观察样品时可直接将新鲜样品使用双面碳膜胶粘贴于样品台, 整个样品处理过程耗时约 15 min (图 1B)。采用 cryo-SEM 观察生物样品时其实验步骤包括: 冷冻固定、镜检冰晶厚度和热升华冰晶(重复这两个步骤, 直至样品表面不再覆盖冰晶)、喷镀、电镜观察。在该方法中, 样品需要多次往返转移电镜样品室与冷冻传输装置, 实验耗时较长, 约 2 h。此外, cryo-SEM 在样品观察前需要 1.5 h 的时间进行电镜设备预冷, 观察完成后需要 5 h 的时间使得电镜设备恢复至室温(图 1C)。对于 print-SEM 实验, 其影印、喷镀和电镜观察的总耗时约

25 min (图 1D)。通过对各方法的实验周期进行对比可知, 常规 SEM 实验制样耗时最长, cryo-SEM 实验耗时较长, print-SEM 实验耗时较短, ESEM 实验耗时最短。从实验繁琐程度方面来讲, cryo-SEM 实验最繁琐, 常规 SEM 制样实验相对繁琐, print-SEM 实验相对简单, ESEM 实验最简单。实验周期及实验繁琐程度的对比情况见表 1。

2.3 镜检效果对比

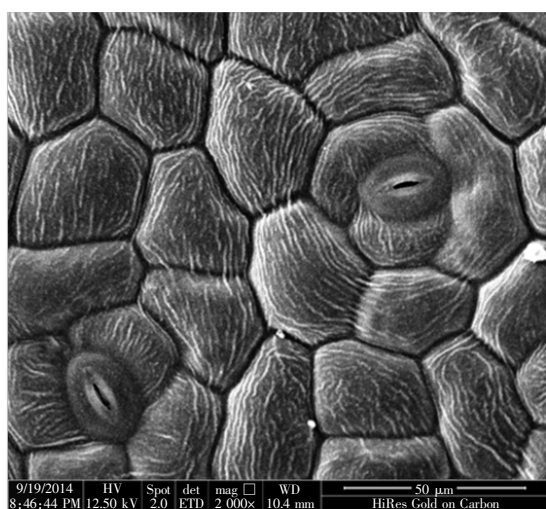
从图 2 可知, 对于常规 SEM 制样实验获得的棉花叶片样品, 通过 2 000 倍放大倍数观察时, 可以清楚地观察到叶片表面的每一个细胞(图 2A); 通过 8 000 倍的放大, 将视野聚焦到单个气孔时, 也可以清晰地观察到气孔的表面结构(图 2B), 这表现出了很高的分辨率和衬度。当然, 镜检过程中也可以观察到气孔不够饱满, 表皮细胞间不连续, 存在沟壑(图 2), 这主要是由于制样过程存在一定程度的失水。

ESEM 可以直接观察裁取的棉花叶片样品, 通过 2 000 倍的放大, 我们同样可以清楚地观察到叶片表面的每一个细胞, 但是细胞呈现严重的褶皱(图 3A); 通过 8 000 倍的放大, 将视野聚焦到单个气孔时, 我们也可以清晰地观察到气孔的表

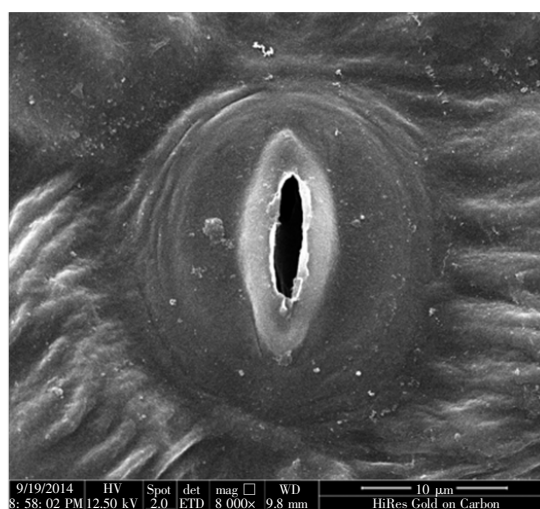
表 1 制样过程比较

Table 1 Comparison of sample preparation process

Classification	Fixation method	Sample size	Sample cycle time	Technical difficulty
SEM	Chemical fixation	2 mm×2 mm	18 h	Difficult
ESEM	Without fixation	5 mm×5 mm	15 min	Easy
Cryo-SEM	Cryofixation	2 mm×2 mm	2 h	Very difficult
Print-SEM	Imprinting	5 mm×5 mm	25 min	Easy



(A)



(B)

图 2 常规扫描电镜制样实验观察到的棉花叶片表面

Fig.2 The surface of cotton leaves observed by SEM

面结构(图 3B)。总的来讲, ESEM 实验也存在气孔不够饱满, 表皮细胞不连续, 出现沟壑的情况, 但是与常规 SEM 生物制样实验相比分辨率与衬度较低, 导电效果不均一(图 3)。

采用 cryo-SEM 观察棉花叶片样品时, 根据 cryo-SEM 的工作原理, 高电压观察时会产生强烈的荷电, 故选择了 5 kV 的低电压进行观察, 在该电压下, 钨灯丝扫描电镜无法做到高放大倍数观察, 并且与其他方法相比, 在同等放大倍数下明显表现出分辨率与衬度的下降, 为了保证图片效果, 故相应减小了放大倍数。图 4 结果显示, 通过 500 倍的放大, 可以清楚地观察到气孔的大视野的叶片表面, 细胞纹理清晰自然(图 4A); 通过 2 000 倍的放大, 将视野聚焦到单个气孔时, 可以较清晰地

观察到气孔的表面结构, 气孔和表皮细胞饱满且连续, 存在荷电现象(图 4B)。

在 print-SEM 实验中, 通过 2 000 倍的放大, 可以清楚地观察到叶片表面每一个细胞的镜像(图 5A); 通过 8 000 倍的放大, 将视野聚焦到单个气孔时, 也可以清晰地观察到气孔镜像的表面结构(图 5B), 气孔保卫细胞饱满, 表皮细胞纹理清晰且连续, 表现出了很高的分辨率与衬度, 但是细胞间隙出现明显的尖端放电现象。进一步通过 ImageJ 图片处理软件, 将所得到的图片反向重构, 得到清晰连续的表皮细胞显微图片(图 5C), 在 8 000 倍视野下可以看到, 样品表面存在一定的龟裂(图 5D)。

根据上述 4 种不同制样方法的镜检图片, 表2

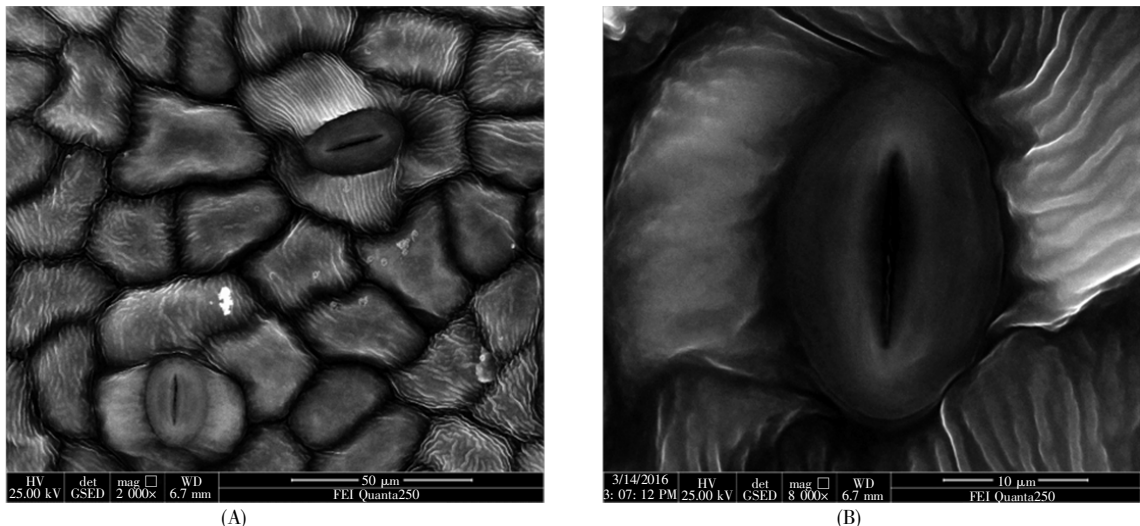


图 3 环境扫描电子显微镜实验观察到的棉花叶片表面
Fig.3 The surface of cotton leaves observed by ESEM

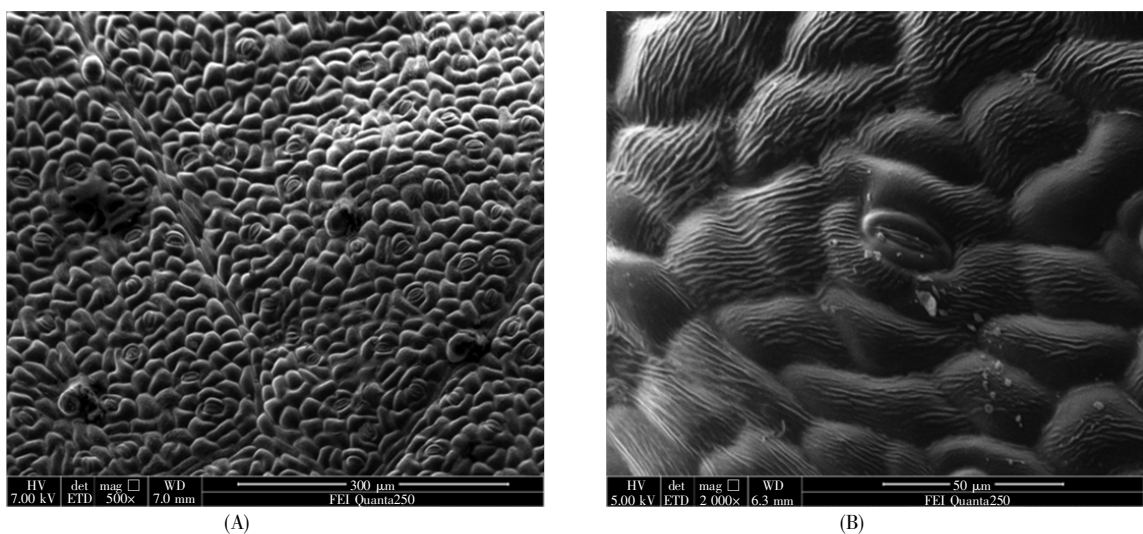


图 4 冷冻扫描电子显微镜实验观察到的棉花叶片表面
Fig.4 The surface of cotton leaves observed by cryo-SEM

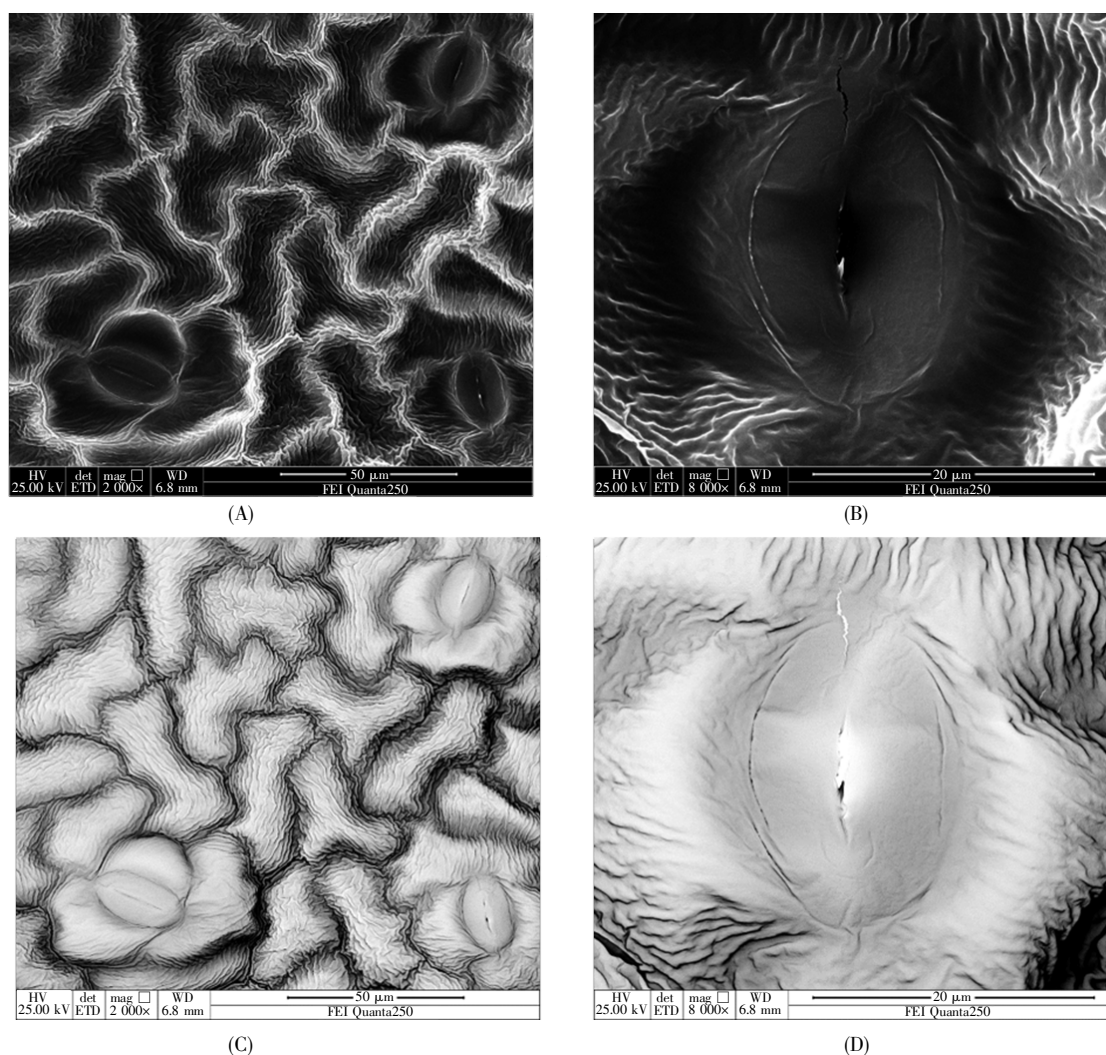


图5 涂撕法扫描电镜制样实验观察到的棉花叶片表面
Fig.5 The surface of cotton leaves observed by print-SEM

整理了它们在放大倍数、图像分辨率、细胞状态和荷电现象方面的差异。

2.4 细胞形态的分析比较

通过对比4种方法所得到的棉花气孔扫描电镜图片,我们发现常规SEM制样实验和ESEM实验所得到的气孔均呈现张开状态,而cryo-SEM实验和print-SEM实验所得到的气孔均处于关闭状态(图6A)。气孔长宽比是反应气孔开闭状态的重要参数,通过ImageJ软件测量了4种实验方法所拍得的各10组气孔的长度和宽度,并进一步

计算出了气孔长宽比。统计学分析显示 cryo-SEM 实验、print-SEM 实验和 ESEM 实验所拍得的气孔的长宽比,极显著高于常规 SEM 制样实验所拍得的气孔的长宽比(图6B),这与电镜图片相符。虽然 ESEM 实验所拍得的气孔有一定程度的张开,且长宽比平均值小于 cryo-SEM 实验和 print-SEM 实验所拍得的气孔的长宽比,但是统计学分析显示三者之间没有明显的差异(图6B)。

进一步通过 Photoshop 软件扣取4种实验方法下棉花表皮细胞所呈现的主要形态,并绘制了

表2 镜检结果比较
Table 2 Comparison of microscopy results

Classification	Effective magnification	Resolution	Cell state	Charge
SEM	8 000	High	Slight shrinkage	Low
ESEM	8 000	Medium	Shrinkage	High
Cryo-SEM	2 000	Low	Full	High
Print-SEM	8 000	High	Full	Medium

这些形态的轮廓。对轮廓图进行分析发现, cryo-SEM 实验和 print-SEM 实验所得到的棉花表皮细胞呈现出修长、自然延伸状态(图 7C, D), 而常规 SEM 制样实验和 ESEM 实验所得到的棉花表皮细胞呈现出短小、生长弯曲的状态(图 7A, B)。分别将 cryo-SEM 实验和 print-SEM 实验所拍得的棉花表皮细胞, 以及常规 SEM 制样实验和 ESEM 实验所拍得的棉花表皮细胞的绘制轮廓进行叠加, 发现两者皆能较好地叠加在一起(图 7E, F)。

3 讨论

本研究结果显示: 采用常规 SEM 生物制样方法观察棉花叶片表皮细胞时, 过程最繁琐, 耗时

最长(图 1)。镜检下样品在很高的放大倍数下依然保持着较高的分辨率和衬度, 但是由于化学固定法原理的局限性, 镜检样品表现出一定程度的失水(图 2); 采用 ESEM 实验观察棉花叶片表皮细胞时, 过程最简单, 耗时最短, 可以观察较大的样品(图 1), 但是镜检样品同常规 SEM 生物制样方法一样, 表现出了一定程度的失水, 且同等放大倍数下其分辨率和衬度仅优于 cryo-SEM 实验; 采用 cryo-SEM 实验观察棉花叶片表皮细胞时, 过程较繁琐, 耗时较长, 操作难度最高(图 1, 表 1)。同时, 与预期一致, cryo-SEM 的镜检结果未表现出失水(图 4), 但由于冷冻扫描技术的局限, 冷冻扫描样品的导电效果较差, 故只能采用低电压和低电

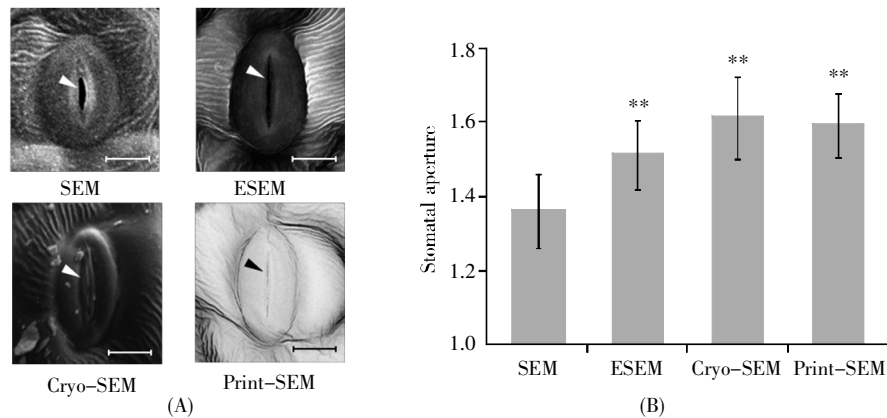


图 6 不同电镜制样方法观察到的棉花气孔开度 (A) 棉花气孔开度的扫描电镜观察结果。箭头指示气孔的开闭状态, 标尺: 5 μm ; (B) 气孔长宽比。**: 与常规 SEM 观察组相比 $P < 0.01$ 。

Fig.6 The cotton stomatal aperture observed by different SEM methods

(A) SEM observations of stomatal aperture. The arrow shows the opening or closing status of stomata and the scale bar indicates 5 μm ; (B) The aspect ratio of stomata. **: $P < 0.01$, compared with SEM observation group.

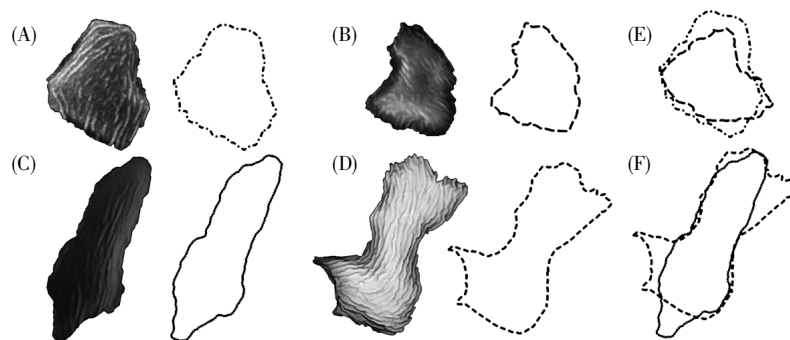


图 7 不同方法观察到的棉花表皮细胞的差异

(A) 常规扫描电镜制样观察到的表皮细胞; (B) 环境扫描电镜观察到的表皮细胞; (C) 冷冻扫描电镜实验观察到的表皮细胞; (D) 涂撕法扫描电镜实验观察到的表皮细胞; (E) 常规扫描电镜和环境扫描电镜制样方法所观察到的表皮细胞的重叠; (F) 冷冻扫描电镜和涂撕法扫描电镜制样方法所观察到的表皮细胞的重叠。

Fig.7 Differences of cotton epidermal cells observed by different methods

(A) Epidermal cells observed by SEM with conventional scanning electroscop sampling method; (B) Epidermal cells observed by ESEM; (C) Epidermal cells observed by cryo-SEM; (D) Epidermal cells observed by print-SEM; (E) The overlap of epidermal cells observed by normal SEM and ESEM; (F) The overlap of epidermal cells observed by cryo-SEM and print-SEM.

子术斑(spot)来降低荷电现象。另外,同等放大倍数下,该方法的分辨率和衬度最低。场发射扫描电子显微镜具有低电压模式,与其搭配的冷台在高放大倍数下应该能达到更好的效果;采用 print-SEM 实验观察棉花叶片表皮细胞时,过程简单,耗时较少(图 1),并且样品未表现出失水,分辨率和衬度也较高,但是涂撕法样品出现了明显的尖端放电现象(图 5)。

一般认为,采用 cryo-SEM 观察样品表面形态时,视野中所呈现出的显微结构更接近于样品本身形貌。在本实验中, cryo-SEM 实验和 print-SEM 实验无论是观察到的棉花气孔还是表皮细胞的形态,都表现出不同程度的一致性(图 6 和图 7),说明这两种实验制样方法所获得的样品因为水分丧失造成的形貌改变均较小。另外,常规 SEM 制样实验和 ESEM 实验观察到的棉花表皮细胞也表现出了较好的一致性,但在棉花气孔形态方面存在明显差异(图 6 和图 7),这可能是由于气孔保卫细胞里有丰富的细胞微管骨架,与表皮细胞相比,棉花气孔的形态更难发生变化,所以在棉花叶片失水的条件下,先引起表皮细胞的形态变化,后引起气孔保卫细胞形态的变化,故 ESEM 实验所观察到的棉花叶片表面形貌较常规 SEM 制样实验更接近于棉花样品本身形貌。

综上所述,本文采取的 4 种不同扫描电子显微镜制样方法都可以用来观察棉花叶片的气孔。如果需要棉花气孔密度类的统计数据,可以通过 ESEM 和 print-SEM 的方法进行实验,它们将在最短的时间内得到大量的实验数据;如果需要气孔大小类的统计数据,可以通过 cryo-SEM 和 print-SEM 两种方法来得到较为精确的实验数据;如果需要棉花气孔形貌的图片数据,可以通过 cryo-SEM 的方法进行实验,以得到最精准的图片数据;如果需要观察保卫细胞表面形态的图片数据,可以使用常规 SEM 生物制样方法来得到高分辨率的图片。

参考文献(References):

- [1] 吴志军, 江东坡. 中国棉花经济的研究综述[J]. 贵州农业科学 (WU Zhi-jun, JIANG Dong-po. The research trend of cotton economy in China[J]. Guizhou Agricultural Sciences), 2008, 36 (3): 173-179.
- [2] 田又升, 范术丽, 庞朝友, 等. 全生育期干旱胁迫对棉花形态、生理、光合作用和产量的影响[J]. 华北农学报(TIAN You-sheng, FAN Shu-li, PANG Chao-you, *et al.* Effects of drought stress in the whole period on cotton morphology, physiology, photosynthesis and yield[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica), 2017, 32(5): 228-235.
- [3] 刘瑞显, 王友华, 陈兵林, 等. 花铃期干旱胁迫下氮素水平对棉花光合作用与叶绿素荧光特性的影响[J]. 作物学报(LIU Rui-xian, WANG You-hua, CHEN Bing-lin, *et al.* Effects of nitrogen levels on photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics under drought stress in cotton flowering and boll-forming stage[J]. Acta Agronomica Sinica), 2008, 34(4): 675-683.
- [4] 曹五七, 李逊, 谢林, 等. 杂种棉花叶片气孔形态及数量的扫描电镜观察[J]. 四川农业大学学报(CAO Wu-qi, LI Xun, XIE Lin, *et al.* Observation of hybrid cotton leave stoma with scanning electron microscope[J]. Journal of Sichuan Agricultural University), 1995, 13(2): 158-160, 256.
- [5] 武开业. 扫描电子显微镜原理及特点[J]. 科技信息(WU Kai-ye. Principle and characteristics of scanning electron microscope[J]. Science and Technology Information), 2010, 29: 113.
- [6] 王振国, 李正博. 浅谈常规扫描电子显微镜的使用[J]. 分析仪器(WANG Zhen-guo, LI Zheng-bo. The use of conventional scanning electron microscopy[J]. Analytical Instrumentation), 2016, 5: 75-78.
- [7] 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(XIAO Yuan, LIU Wei, WANG Yan, *et al.* Drying methods of biological sample preparation for scanning electron microscope[J]. Research and Exploration in Laboratory), 2013, 32(5): 45-53, 172.
- [8] 张慧蓉, 于巧丽, 田鹏, 等. 环境扫描电子显微镜的工作原理和操作维护[J]. 分析仪器(ZHANG Hui-rong, YU Qiao-li, TIAN Peng, *et al.* Working principle, operation and maintenance of environmental scanning electrical microscope[J]. Analytical Instrumentation), 2015, 5: 77-80.
- [9] MAIA-BRIGAGÃO C, DE SOUZA W. Using environmental scanning electron microscopy (ESEM) as a quantitative method to analyse the attachment of *Giardia duodenalis* to epithelial cells[J]. Micron, 2012, 43(2-3): 494-496.
- [10] 郭素枝. 扫描电镜技术及其应用[M]. 厦门: 厦门大学出版社 (GUO Su-zhi. Scanning Electron Microscopy and Its Applications[M]. Xiamen: Xiamen University Press), 2006: 5-22.
- [11] 肖媛, 李婷婷, 周芳, 等. 冷冻扫描电镜及其在生命科学中的应用[J]. 电子显微学报(XIAO Yuan, LI Ting-ting, ZHOU Fang, *et al.* Cryo-scanning electron microscopy and its application in the research of life science[J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society), 2015, 34(5): 447-451.
- [12] 肖媛, 邢振飞, 周芳, 等. 水生植物冷冻扫描电镜和常规扫描电镜成像效果比较[J]. 电子显微学报(XIAO Yuan, XING Zhen-fei, ZHOU Fang, *et al.* Comparison of the imaging effects of cryo-scanning electron microscopy and conventional scanning electron microscopy on aquatic plants[J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society), 2017, 36(2): 173-176.
- [13] 刘明智, 努尔巴衣·阿布都沙力克, 潘晓玲. 指甲油涂抹撕取法制取植物叶气孔装片[J]. 生物学通报(LIU Ming-zhi, NUR-BAY ABDUSALIH, PAN Xiao-ling. The stomatal film of plant leaves was prepared by applying nail polish and tearing[J]. Bulletin of Biology), 2005, 40(10): 44.
- [14] 张秀芳, 石东里, 张兰. 观察植物气孔结构的简易方法[J]. 生物学通报(ZHANG Xiu-fang, SHI Dong-li, ZHANG Lan. A simple method to observe the stomatal structure of plants[J]. Bulletin of Biology), 2002, 37(6): 42.