

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017年6月8日 (08.06.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/092136 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 21/45 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/099648

(22) 国际申请日: 2015年12月30日 (30.12.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201510852183.4 2015年11月30日 (30.11.2015) CN

(71) 申请人: 江苏大学 (JIANGSU UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。

(72) 发明人: 李青林 (LI, Qinglin); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 毛罕平 (MAO, Hanping); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 左志宇 (ZUO, Zhiyu); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 倪纪恒 (NI, Jiheng); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 孙俊 (SUN, Jun); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 张晓东

(ZHANG, Xiaodong); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。

(74) 代理人: 北京德崇智捷知识产权代理有限公司 (JW IP LAW FIRM); 中国北京市朝阳区酒仙桥路 14 号 A5 楼 7 层 701, Beijing 100015 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,

[见续页]

(54) Title: QUICK MEASUREMENT METHOD FOR BLADE SURFACE MICROSTRUCTURE BASED ON LIGHT INTERFERENCE TECHNOLOGY

(54) 发明名称: 一种基于光干涉技术的叶片表面微结构快速测量方法

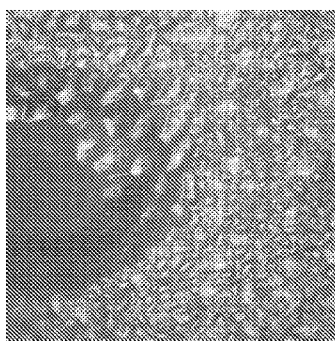


图 3-a

(57) Abstract: A quick measurement method for a blade surface microstructure based on light interference technology. The micro-morphologic characteristics of a blade surface are obtained using an optical measurement method instead of scanning electron microscope technology and are quantitatively characterized, so that the problems that the characteristics of the blade surface cannot be directly and quickly obtained and quantitatively characterized are solved. The method has the advantages of quickness, simplicity, easiness, capability of performing quantitative analysis and the like, and can be applied to the quick measurement of a blade surface microstructure.

(57) 摘要: 一种基于光干涉技术的叶片表面微结构快速测量方法, 采用光学测量方法代替扫描电镜技术获取叶片表面的微观形态特征, 并加以定量表征, 解决了叶片表面特征无法直接快速获取、定量进行表征的问题, 具有快速、简单易行、可以定量分析等优点, 可应用于叶片表面微结构快速测量。



WO 2017/092136 A1



IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD,
TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

一种基于光干涉技术的叶片表面微结构快速测量方法

技术领域

本发明涉及一种植物生理领域，具体涉及一种叶片表面微结构快速测量技术。

背景技术

植物营养学的研究已经证明，叶片作为植物的营养器官，其生长发育状态直接受养分供给的影响。营养水平变化影响植物正常代谢活动，引起植物叶片表面气孔、绒毛、维管束等微结构形态和密度的变化。因此，获取叶片表面的微结构特征对于作物养分诊断和科学研究具有重要的意义。

叶片表面微结构内活性物质、酶、蛋白质等的变化，造成叶片组织细胞形态、细胞排列以及细胞内含物等一系列微观结构信息变化，当这些微观变化积累到一定程度才会最终引起叶片颜色、大小等宏观特征的变化。因此，可以通过观测叶片表面微观结构特征变化，对作物的养分水平进行早期诊断。目前常用的方法是扫描电镜方法获取叶片表面微结构，该方法前处理复杂，处理周期长，不能实时了解作物的养分情况。本发明试图提供一种叶片表面微结构快速测量方法。

现有物体表面微结构检测方法主要有：扫描电子显微镜（SEM）成像法，原子力显微成像法以及光干涉成像法等。

对于叶片表面微结构的研究方法目前主要是扫描电镜（SEM）成像法，扫描电子显微镜是将电子束在样品上进行动态扫描时，将样品上带有形态和结构信息的二次电子逐点逐行地轰击出表面，经检测器处理后再屏幕上显示样品表面的高分辨形貌图像。因为植物叶片含水分较多，且导电性差，因此在成像之前需要进行干燥、喷金等处理，前处理复杂，处理周期长。

原子力显微镜（atomic force microscopy, AFM）的核心结构是一个对力非常敏感的微悬臂，其尖端有一个微小的探针。当探针靠近样品表面时，探针尖端的原子与样品表面的原子之间产生极其微弱的作用力，从而使微悬臂弯曲。探测器将微悬臂的形变信号转换成电信号进行放大，就可以得到原子之间力的微弱变化信号，获得作用力的分布信息，从而以纳米级分辨率获得作用力分布信息，从而以纳米级分辨率获得表面形貌结构。大多数植物叶片表面都分布有绒毛，绒毛的高度和直径一般从几微米到几十微米，有的叶片表面绒毛高度可以达到几百微米，尺寸远远大于扫描探针，若对叶片表面进行扫描，会造成探针折断等问题，因此不适合用该方法进行叶片表面结构的测量。

光干涉测量，是一种利用光干涉原理测量光程差从而测定被测对象表面微结构的方

法。两束相干光间光程差的任何变化会非常灵敏地导致干涉条纹的移动，而某一束光的光程变化是由它通过的几何路程的变化引起，所以干涉条纹的移动变化可测量几何长度的微小该变量。该方法具有非接触测量、快速、高精度，在表面微结构测量方面应用广泛，目前该方法主要用于材料表面和机械加工表面的测量中。但未见借助该方法测量叶片表面微结构的研究报道。

现有的叶片表面微结构测量方法存在前处理复杂、处理周期长的问题。本方法采用光干涉技术对叶片表面进行成像和三维形态的表征，无需任何前处理，解决了目前测量方法前处理复杂，处理周期长的问题。

发明内容

本发明目的在于提供一种基于光干涉技术的叶片表面微结构快速测量方法，以实现快速、简单地采集叶片表面气孔、绒毛等微结构特征；并对微结构特征进行表征。为了解决以上技术问题，本发明采用的具体技术方案如下：

一种基于光干涉技术的植物叶片表面微结构快速测量方法，其特征在于包括以下步骤：

步骤一，取样并固定：避开主脉切取叶片组织得叶片样本，叶片样本大小为 2cm*2cm，并对叶片样本用浓度为 4%的戊二醛固定液进行固定；所述的固定为将叶片放到溶液里面，保持其细胞器形态；

步骤二，将所述叶片样本水平置于载玻片上；

步骤三：将载有叶片样本的载玻片放置于载物台上，使载玻片底面紧贴载物台上表面；使叶片样本位于镜头正下方；

步骤四：采用 LED 光源对所述叶片样本进行照明；

步骤五：利用光学成像系统，对待测区的叶片样本表面进行成像，根据叶片样本的不同微结构特征，确定不同结构观察时的扫描距离；

步骤六：确定叶片样本表面微结构的测量基准，获取测量系统测量能评价黄瓜叶片样本表面各微结构的主要参数，包括几何形态参数、高度参数、剖面参数、体积参数。

所述步骤二具体为：将叶片样本正面朝下，使叶片样本紧贴于 25.4mm×76.2mm 载玻片，并处于水平。

所述步骤四具体为：在给定的四种照明方式中选择高亮度 LED 照明；所述四种照明方式为：反射明视场 LED 照明、反射暗视场 LED 照明、高亮度 LED 照明和透射 LED 照明。

所述步骤五具体为：观察气孔、叶肉细胞以及维管束时，采集的高度范围是 20um；需要观察绒毛时，采集的高度范围是 200um。

所述测量基准为叶片样本的叶肉组织表皮细胞的最低点；利用光学测量系统，测量所述叶片样本表面的微结构特征包括：叶片表面气孔、叶肉表皮细胞、维管束、绒毛的形态特征；所述气孔用几何测量方法来测量其大小，用高度测量、剖面测量和体积测量方法来测量气孔形态并加以表征；叶肉细胞形态用指定 50um*50um 区域内叶肉细胞的体积测量来表征叶肉细胞的形态特征；用几何测量、剖面测量和体积测量的方法来表征维管束的特征。

本发明具有有益效果。本发明借助光干涉技术，可以快速、简便地获取叶片表面微结构；本发明从微观尺度出发，探求了叶片表面微结构特征的表达参数，能定量描述叶片表面的各微结构特征；本发明可以通过对表面微结构参数的定量分析，为作物的生长状态评价提供依据；本发明提供了一种叶片表面微结构的快速测量方法。

附图说明

图 1 本发明一种基于光干涉技术的叶片表面微结构测量方法的测量光路示意图。

图 2 是本发明测量原理示意图。

图 3-a 是本发明黄瓜叶片表面绒毛二维结构图

图 3-b 是本发明黄瓜叶片表面绒毛三维结构图

图 3-c 是本发明黄瓜叶片表面绒毛高度测量云图

图 4-a 是本发明黄瓜叶片表面气孔和叶肉细胞二维结构图

图 4-b 是本发明黄瓜叶片表面气孔和叶肉细胞三维结构图

图 4-c 是本发明黄瓜叶片表面气孔和叶肉细胞高度测量云图

具体实施方式

下面以黄瓜为例，结合附图和具体实施例对本发明的技术方案做进一步详细说明。

本实施例中所采用的显微镜系统是由日本奥林巴斯公司生产的 DSX500 型，该测量系统主要包括 LED 光源，利用该显微系统中的显微图像采集系统采集温室番茄叶片的表面结构。本发明于 2015 年 3 月至 2015 年 8 月在江苏大学现代农业装备与技术教育部重点实验室玻璃温室中进行实验，黄瓜品种选用津春四号。

(1) 样本表面微结构固定

为保证黄瓜叶片在取样后观察时保持生长时的表面微结构状态，在温室取样后立刻投入事先配好的戊二醛固定液中。

(2) 放置

因为植物组织较柔软的特殊性，不能保证和金属样本一样紧贴载物台表面，因此本发明中采用了载玻片的方法，将黄瓜叶片样本放在载玻片之后，置于载物台。也即从固定液中取出，立刻置于 $25.4 \times 76.2\text{mm}$ 的载玻片上，叶片正面朝下，背面朝上，并使叶片紧贴载玻片以保证叶肉样本处于水平状态。

(3) 调整

调整物镜和载物台之间的距离（Z 向）使图像聚焦，根据测量对象的不同，选择合适的采集范围。因为黄瓜叶片表面绒毛高度远远大于气孔、叶肉细胞以及维管束的高度，所以在观察时，需要调整镜头 Z 方向距离。观察气孔、叶肉细胞以及维管束时，采集的高度范围是 $20\mu\text{m}$ ，用精细采集模式进行采集；需要观察绒毛时，重新进行聚焦成像，此时设置采集的高度范围是 $200\mu\text{m}$ ，用精细采集模式进行采集。

(4) 叶片表面结构观察

在显微系统下观察叶片表面气孔、叶肉细胞、维管束和绒毛的几何特征，分别进行 2D 和 3D 成像，选取典型视野拍照（图 3 和图 4）。

叶片表面显微结构观察表明，光干涉技术能快速获取叶片表面气孔、叶肉细胞、维管束以及绒毛等结构的 2D 和 3D 图像，图像能清晰地反映叶片表面的各种微结构。

(5) 测量叶片各特征结构的形态参数

测量气孔、叶肉细胞、维管束以及绒毛等结构的形态参数，包括几何测量、高度测量、剖面测量、体积测量。每个样本观察至少统计 10 个视野，取平均值。

①气孔的形态参数：因为气孔的大小和形态直接影响作物的生理状态，所以用几何测量方法来测量气孔的大小；用高度测量、剖面测量和体积测量方法来综合表征气孔的形态特征。

②叶肉细胞的形态参数：叶肉表皮细胞是叶片表面分布最丰富的细胞，各个细胞的形态存在一定差异，因此在评价叶肉细胞是，采用指定 $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ 区域叶肉表皮细胞的体积测量在表征叶肉表皮细胞的形态特征。

③维管束的形态参数：叶片表面维管束分布具有一定的规律性，但维管束直径因其分布位置的不同，存在较大差异，所以选择几何测量、剖面测量和体积测量的方法来表征维管束的形态参数。

④绒毛的形态参数：绒毛的高度远远大于叶片表面的其它微结构的高度，因此用高度和体积参数来表征其形态。

权 利 要 求 书

1. 一种基于光干涉技术的植物叶片表面微结构快速测量方法，其特征在于包括以下步骤：

步骤一，取样并固定：避开主脉切取叶片组织得叶片样本，叶片样本大小为 2cm*2cm，并对叶片样本用浓度为 4%的戊二醛固定液进行固定；所述的固定为将叶片放到溶液里面，保持其细胞器形态；

步骤二，将所述叶片样本水平置于载玻片上；

步骤三：将载有叶片样本的载玻片放置于载物台上，使载玻片底面紧贴载物台上表面；使叶片样本位于镜头正下方；

步骤四：采用 LED 光源对所述叶片样本进行照明；

步骤五：利用光学成像系统，对待测区的叶片样本表面进行成像，根据叶片样本的不同微结构特征，确定不同结构观察时的扫描距离；

步骤六：确定叶片样本表面微结构的测量基准，获取测量系统测量能评价黄瓜叶片样本表面各微结构的主要参数，包括几何形态参数、高度参数、剖面参数、体积参数。

2. 根据权利要求 1 所述的一种基于光干涉技术的叶片表面微结构测量方法，其特征在于所述步骤二具体为：将叶片样本正面朝下，使叶片样本紧贴于 25.4mm×76.2mm 载玻片，并处于水平。

3. 根据权利要求 1 所述的一种基于光干涉技术的叶片表面微结构测量方法，其特征在于所述步骤四具体为：在给定的四种照明方式中选择高亮度 LED 照明；所述四种照明方式为：反射明视场 LED 照明、反射暗视场 LED 照明、高亮度 LED 照明和透射 LED 照明。

4. 根据权利要求 1 所述的一种基于光干涉技术的叶片表面微结构测量方法，其特征在于所述步骤五具体为：观察气孔、叶肉细胞以及维管束时，采集的高度范围是 20um；需要观察绒毛时，采集的高度范围是 200um。

5. 根据权利要求 1 所述的一种基于光干涉技术的叶片表面微结构测量方法，其特征在于：所述测量基准为叶片样本的叶肉组织表皮细胞的最低点；利用光学测量系统，测量所述叶片样本表面的微结构特征包括：叶片表面气孔、叶肉表皮细胞、维管束、绒毛的形态特征；所述气孔用几何测量方法来测量其大小，用高度测量、剖面测量和体积测量方法来测量气孔形态并加以表征；叶肉细胞形态用指定 50um*50um 区域内叶肉细胞的体积测量来表征叶肉细胞的形态特征；用几何测量、剖面测量和体积测量的方法来表征维管束的特征。

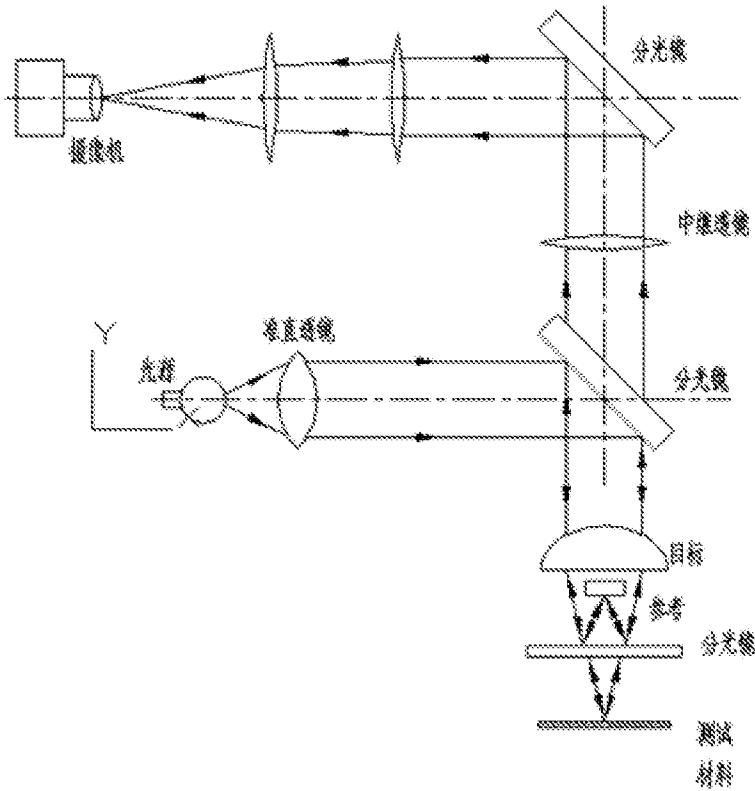


图 1

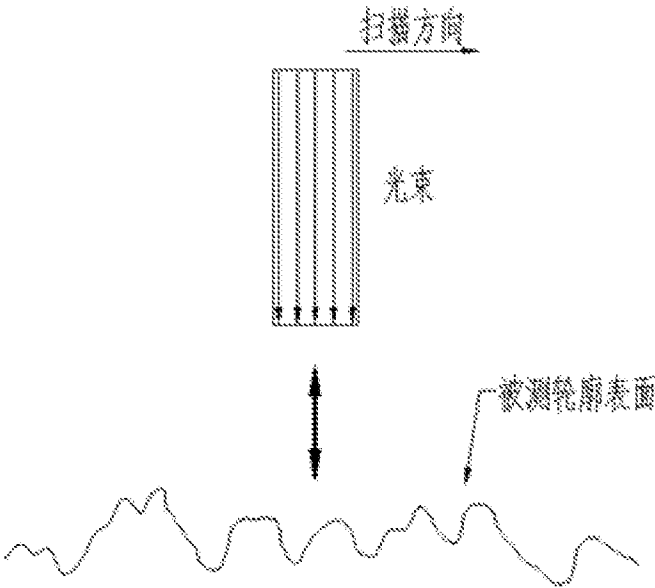


图 2

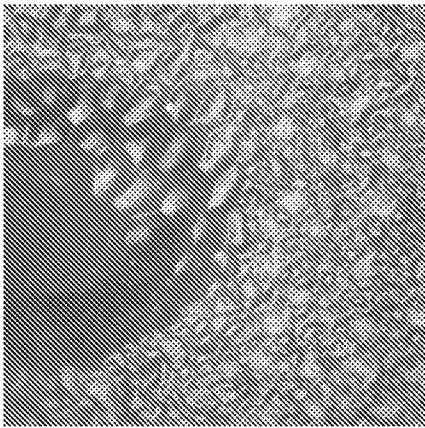


图 3-a

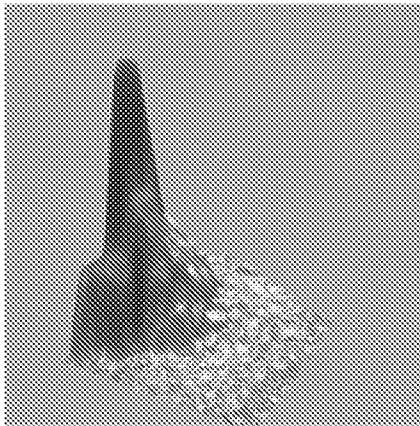


图 3-b

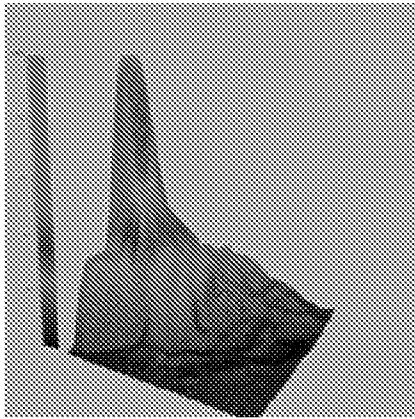


图 3-c

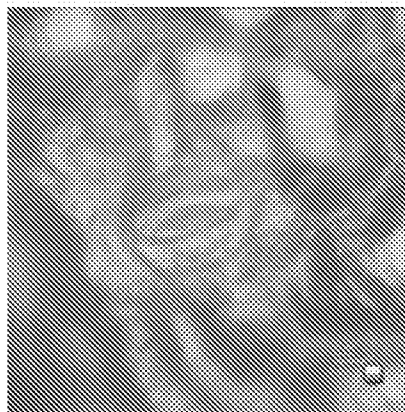


图 4-a

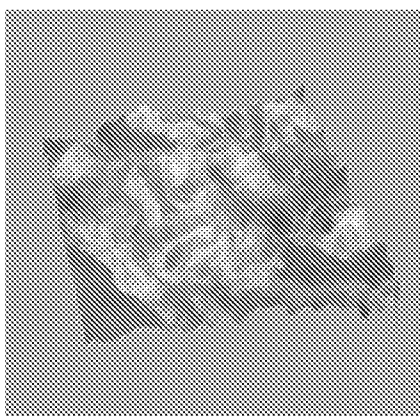


图 4-b

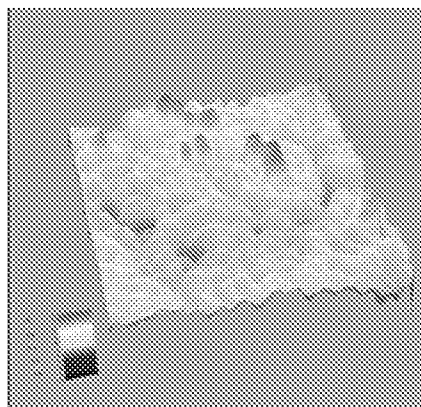


图 4-c

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/099648

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 21/45 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 21; G01N 1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CJFD; CNABS; CPRSABS; VEN; CNKI: LED, plants, leaf, intervene, surface, structure, immobi+, sample, scan

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 103575700 A (CRYSTALVUE MEDICAL CORPORATION), 12 February 2014 (12.02.2014), description, paragraphs [0037]-[0041]	1-5
Y	QI, Hongyan et al., "Effect of Water Deficit on Stomatal Characteristics and Ultrastructure of Chloroplast in Tomato Leaves", ACTA BOTANICA BOREALI-OccIDENTALIA SINICA, vol. 29, no. 01, 31 December 2009 (31.12.2009), page 10, columns 1 and 2	1-5
A	CN 101975780 A (HUNAN AGRICULTURAL UNIVERSITY), 16 February 2011 (16.02.2011), the whole document	1-5
A	JP 2000304694 A (KAWASAKI KIKO KK), 02 November 2000 (02.11.2000), the whole document	1-5
A	CN 102759510 A (ZHEJIANG UNIVERSITY), 31 October 2012 (31.10.2012), the whole document	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 26 August 2016 (26.08.2016)	Date of mailing of the international search report 05 September 2016 (05.09.2016)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer SUN, Meng Telephone No.: (86-10) 62085645

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/099648

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103575700 A	12 February 2014	TW 201405117 A	01 February 2014
		TW I480534 B	11 April 2015
CN 101975780 A	16 February 2011	CN 101975780 B	11 January 2012
JP 2000304694 A	02 November 2000	None	
CN 102759510 A	31 October 2012	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/099648

A. 主题的分类 G01N 21/45 (2006.01) i 按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号) G01N21; ;G01N1 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用)) CJFD;CNABS;CPRSABS;VEN;CNKI;植物, 叶片, 干涉, 表面, 结构, 固定, 样本, LED, 扫描, plants, leaf, intervene, surface, structure, immobi+, sample, scan		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 103575700 A (明达医学科技股份有限公司) 2014年 2月 12日 (2014 - 02 - 12) 说明书0037-0041段	1-5
Y	齐红岩等. "水分亏缺对番茄叶片气孔特性及叶绿体超微结构的影响" 西北植物学报, 第29卷, 第01期, 2009年 12月 31日 (2009 - 12 - 31), 第10页第1-2栏	1-5
A	CN 101975780 A (湖南农业大学) 2011年 2月 16日 (2011 - 02 - 16) 全文	1-5
A	JP 2000304694 A (KAWASAKI KIKO KK) 2000年 11月 2日 (2000 - 11 - 02) 全文	1-5
A	CN 102759510 A (浙江大学) 2012年 10月 31日 (2012 - 10 - 31) 全文	1-5
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2016年 8月 26日		国际检索报告邮寄日期 2016年 9月 5日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 孙劭 电话号码 (86-10)62085645

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/099648

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103575700	A	2014年 2月 12日	TW	201405117	A	2014年 2月 1日
				TW	I480534	B	2015年 4月 11日
CN	101975780	A	2011年 2月 16日	CN	101975780	B	2012年 1月 11日
JP	2000304694	A	2000年 11月 2日		无		
CN	102759510	A	2012年 10月 31日		无		