

多伞阿魏的冰冻切片方法建立及挥发油、香豆素类成分组织化学定位分析

赵媛媛, 马颖, 刘双双, 刘朦朦, 卢昕, 姚佳琦, 张思维, 朱芸*
(石河子大学药学院, 新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆石河子 832000)

[摘要] 目的:建立多伞阿魏的冰冻切片方法,并对其不同器官中挥发油和香豆素类成分进行组织化学定位研究。方法:以多伞阿魏根、茎、叶柄、叶为材料,考察蔗糖保护剂质量分数、液氮速冻时间、包埋条件、切片厚度、冷冻温度和时间、后处理方式等影响因素,对比冰冻切片的完整度、显微效果、伸卷度和清晰度,进而筛选最佳切片条件。分别利用苏丹IV染色法和荧光显微镜技术定位多伞阿魏的挥发油和香豆素类成分。结果:多伞阿魏根、茎、叶柄、叶冰冻切片的最佳条件为根以质量分数10%、15%、20%梯度蔗糖作为保护剂;茎和叶柄以质量分数10%、20%、30%梯度蔗糖作为保护剂;叶以质量分数20%、25%、30%梯度蔗糖作为保护剂;以胶水-水(2:1)作为包埋剂;液氮速冻20 s, -25 °C回温30 min; -20 °C下切片,切片厚度25 μm;贴片后用相同质量分数的蔗糖溶液冲洗,将切片在冰袋上静置一段时间,于常温条件下保存,其中蔗糖保护剂质量分数是最主要的影响因素。组织化学定位结果显示,多伞阿魏4种器官中挥发油和香豆素类成分均主要分布于树脂道。结论:本研究首次建立了多伞阿魏冰冻切片方法,该方法成片率高、步骤相对简化;多伞阿魏的挥发油和香豆素类成分主要积累在树脂道中。

[关键词] 多伞阿魏; 冰冻切片; 挥发油; 香豆素; 树脂道; 蔗糖

[中图分类号] R22;R28;R931;O766 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)13-0161-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211860 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210824.1127.002.html>

[网络出版日期] 2021-08-24 15:27

Establishment of Cryosectioning Method and Histochemical Localization Analysis of Volatile Oil and Coumarin Components of *Ferula ferulaeoides*

ZHAO Yuanyuan, MA Ying, LIU Shuangshuang, LIU Mengmeng, LU Xin,
YAO Jiaqi, ZHANG Siwei, ZHU Yun*

(Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resource and Utilization, Ministry of Education,
School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the frozen section method of *Ferula ferulaeoides*, and to study the histochemical localization of volatile oil and coumarins in different organs of *F. ferulaeoides*. **Method:** The roots, stems, petioles and leaves of *F. ferulaeoides* were used as materials to investigate the concentration of sucrose protectant, liquid nitrogen flash-freezing time, embedding conditions, section thickness, freezing temperature and time and post-treatment methods, the most suitable section conditions were screened by comparing the integrity, microscopic effect, elongation and clarity of frozen sections. Sudan IV staining method and fluorescence microscopy were used to locate the volatile oil and coumarins of *F. ferulaeoides*. **Result:** The optimal conditions for frozen sections of the roots, stems, petioles and leaves of *F. ferulaeoides* were as follows: 10%, 15% and 20% gradient sucrose as the protectant for roots, 10%, 20% and 30% gradient sucrose as the

[收稿日期] 2021-06-15

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31860041)

[第一作者] 赵媛媛,在读硕士,从事生药鉴定与质量控制的研究,E-mail:2953914647@qq.com

[通信作者] *朱芸,教授,从事新疆特色植物药的鉴定和品质评价方面的研究,Tel:0993-2055002,E-mail:20945549@qq.com

protectant for stems and petioles, 20%, 25% and 30% gradient sucrose as the protectant for leaves, glue-water (2:1) as the embedding agent, quick-freeze in liquid nitrogen for 20 s, warmed up at $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min, sliced at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ with the thickness of $25\text{ }\mu\text{m}$, rinsed with the same concentration of sucrose solution (gradient sucrose solution selected the last concentration), and the slices placed on the ice pack for a period of time and stored at room temperature. Among them, the concentration of sucrose protectant was the most important factor. The results of histochemical localization showed that volatile oil and coumarins in four organs of *F. ferulaeoides* were mainly distributed in resin canal. **Conclusion:** Frozen section of *F. ferulaeoides* is established for the first time with high rate of slicing and simplified steps, its volatile oil and coumarins are mainly accumulated in resin canal.

[Keywords] *Ferula ferulaeoides*; frozen section; volatile oil; coumarin; resin canal; sucrose

多伞阿魏为伞形科阿魏属植物,是新疆地区常用药材之一,其药用部位为根和油胶树脂^[1],主要含有挥发油、树脂、树胶和多糖等化学成分,其中挥发油占比10%~17%,具有抑菌、抗肿瘤和抗炎等作用^[2-5]。香豆素是多伞阿魏主要的活性成分之一,具有抗肿瘤、抗炎和杀虫等作用^[1,5]。

植物化学成分的形成和积累与部位、器官密切相关。组织化学定位是对组织内存在的各类物质进行定位、定性及定量分析的方法,可准确反映药用植物中有效成分积累的部位^[6]。制片效果会直接影响组织定位的准确性,植物组织常用的制片技术包括石蜡切片、半薄切片、冰冻切片和徒手切片等,其中冰冻切片具有速度快、使用试剂少和能最大程度保存组织中的成分等特点,常用于植物组织中挥发油、香豆素、生物碱和皂苷等成分的定位研究^[7]。目前将冰冻切片技术与组织化学定位技术相结合用于植物成分分布和积累的研究已较为广泛^[8-9]。

目前有关多伞阿魏挥发油的研究主要涉及提取工艺改进、化学成分鉴定和药理活性等方面^[4,10-11],对于香豆素类成分的研究多集中于成分鉴定和含量测定^[3,12],针对多伞阿魏的冰冻切片工艺,以及其挥发油和香豆素类成分定位和分布的研究尚未见报道。基于此,本实验拟建立多伞阿魏冰冻切片方法,并利用组织化学定位方法对多伞阿魏根、茎、叶柄、叶中的挥发油和香豆素类成分进行定位,探寻其分布规律,为进一步揭示多伞阿魏挥发油、香豆素类成分的累积规律与组织结构的相关性奠定基础,并为其合理采收利用提供实验依据。

1 材料

1850型冷冻切片机[徕卡(德国)微系统有限公司],Axio Imager M2型正置荧光显微镜(北京博瑞斯科技有限公司)。光学相干层析成像(OCT)冰冻切片包埋剂(北京兰杰柯科技有限公司,批号70101248),加拿大树胶(菏泽市牡丹区百雨金化工

有限公司,批号190825),苏丹IV染色剂(北京索莱宝科技有限公司,批号417B042),试剂均为分析纯。新鲜多伞阿魏材料于2021年4月采自石河子市阿魏滩(经度 $85^{\circ}57'\text{E}$,纬度 $43^{\circ}12'\text{N}$),经石河子大学生命科学学院阎平教授鉴定为伞形科植物多伞阿魏*Ferula ferulaeoides*的全株植物。

2 方法与结果

2.1 多伞阿魏冷冻切片的制作 采用蔗糖保护-液氮速冻法^[13]制作冰冻切片,考察保护剂、冷冻时间和温度、包埋剂等因素;利用分级法^[14]评价切片效果,筛选出最佳切片条件,切片制作过程见增强出版附加材料,评价标准见表1。

表1 多伞阿魏冰冻切片感官评价标准

Table 1 Sensory evaluation criteria for frozen sections of *F. ferulaeoides*

级别	完整度	伸卷度	显微效果	清晰度
I	++	++	++	++
II	+	+	+	+
III	-	-	-	-
IV	--	--	--	--

注:+.切片整体完整度和伸卷度好,显微效果好(细胞重叠和破损少),切片清晰;-。完整度和伸卷度不好,显微效果不好,切片不清晰。符号越多,相应的效果越明显(表2-表7同)

2.1.1 切段 新鲜组织切成长 $0.3\sim 0.5\text{ cm}$ 组织块。

2.1.2 固定 组织块用2.5%戊二醛固定,脱水前抽真空30 min,以除去气泡。

2.1.3 保护剂脱水 新鲜组织用含单一质量分数5%、15%、25%或者梯度质量分数(5%、10%、15%;10%、15%、20%;15%、20%、25%;10%、20%、30%;20%、25%、30%)蔗糖的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)浸泡脱水并抽真空除气泡,各质量分数30 min。

2.1.4 包埋 分别选择OCT包埋剂、胶水、胶水-水(2:1)作为包埋剂。

2.1.5 冷冻 组织块利用直接冷冻和液氮速冻2种

方式分别冷冻。直接冷冻时间设置30 min,温度分别为-20、-25℃;液氮速冻时间分别为20、30 s,同一温度-25℃和时间30 min进行回温。

2.1.6 切片 分别在-20、-25℃下切片,考察切片厚度10、20、25、30 μm对切片质量的影响。

2.1.7 后处理 贴片后,将切片分别用与保护剂质量分数相同的蔗糖PBS(梯度蔗糖选择最高质量分数)或无水乙醇冲洗;最后将切片置于常温条件下或冰袋上逐渐回温。

2.2 香豆素的组织化学定位 实验组按2.1项下优选条件制片,切片直接置于荧光显微镜下,在紫外光(365 nm)激发下观察香豆素自发荧光并拍照^[15-17]。空白组切片在2.1.2项完成后经50%、60%、70%、80%、90%、100%梯度体积分数乙醇各处理30 min,去除组织中的香豆素,其余步骤同实验组。

2.3 挥发油的组织化学定位

2.3.1 染色时间考察 按2.1项下筛选出的条件制片,制作完成的切片用苏丹IV^[18-19]染色,设置不同染色时间(20、10、5、1 min,45、30、20 s),用PBS浸洗3~5 min,稀甘油封片,显微镜检查。

2.3.2 染色 实验组经苏丹IV染色,空白组则不经

过染色,其余步骤同2.3.1项。

2.4 冰冻切片最佳切片条件考察

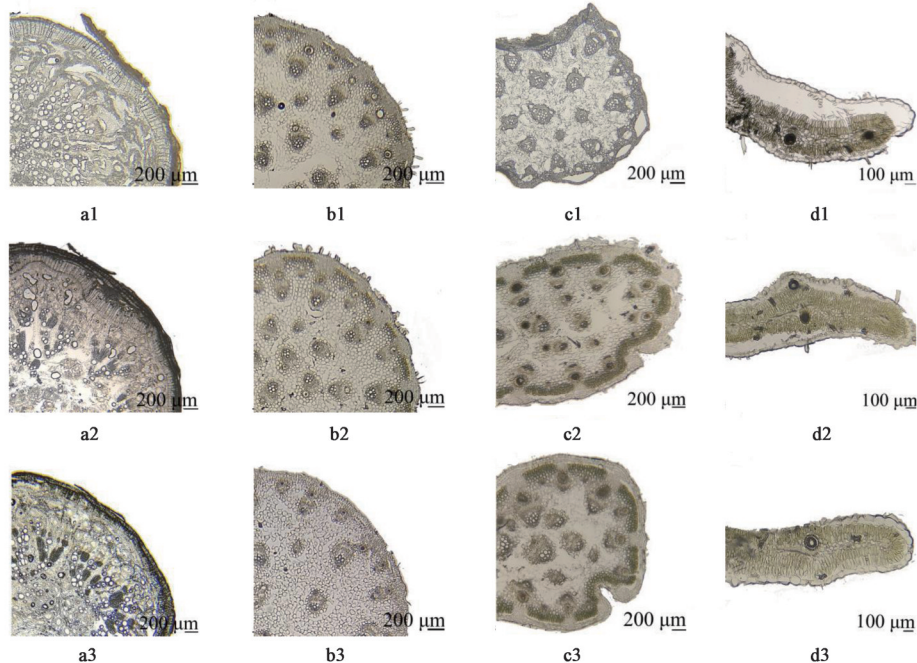
2.4.1 保护剂 由表2和图1可知,蔗糖质量分数会直接影响切片中组织和细胞的完整度,当蔗糖质量分数≤25%且为单一质量分数时,切片完整度均较差;当设置为梯度质量分数时,随质量分数的增加,切片完整度逐渐增高。

表2 多伞阿魏不同器官冰冻切片的蔗糖质量分数筛选

Table 2 Screening of sucrose concentration in frozen sections of different organs of *F. ferulaeoides*

蔗糖质量分数/%	完整度			
	根	茎	叶柄	叶
0	--	--	--	--
5	--	--	--	--
15	-	--	--	--
25	-	-	-	-
5、10、15(梯度)	+	-	-	--
10、15、20(梯度)	++	-	-	-
15、20、25(梯度)	++	+	+	-
10、20、30(梯度)		++	++	+
20、25、30(梯度)				++

注:空白单元格表示未进行此质量分数的试验



注:a. 根;a1. 15%;a2. 25%;a3. 5%、10%、15%梯度;b. 茎;b1. 25%;b2. 10%、15%、20%梯度;b3. 15%、20%、25%梯度;c. 叶柄;c1. 25%;c2. 10%、15%、20%梯度;c3. 15%、20%、25%梯度;d. 叶;d1. 25%;d2. 15%、20%、25%梯度;d3. 10%、20%、30%梯度

图1 不同质量分数蔗糖保护剂下多伞阿魏4种器官的显微观察

Fig. 1 Microscopic observation of four organs of *F. ferulaeoides* under different sucrose protectants

2.4.2 切片厚度 由表3可知,当切片厚度<20 μm时,切片的整体完整度较差,细胞破损严重,显微效

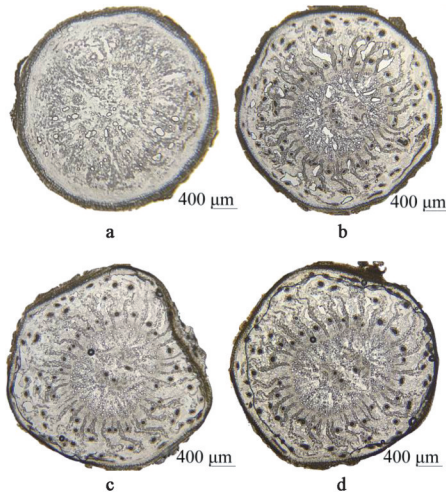
果差;当厚度≥30 μm时,切片的显微效果降低,细胞重叠;当厚度为25 μm时,切片完整度和显微效果均

较好。根不同厚度的切片见图2。

表3 多伞阿魏不同器官冰冻切片的切片厚度筛选

Table 3 Screening of slice thickness for frozen sections of different organs of *F. ferulaeoides*

切片厚度/ μm	完整度				显微效果			
	根	茎	叶柄	叶	根	茎	叶柄	叶
10	--	--	--	--	--	--	--	--
20	+	+	+	+	++	++	++	++
25	++	++	++	++	++	++	++	++
30	++	++	++	++	+	+	+	+



注: a. 10 μm ; b. 20 μm ; c. 25 μm ; d. 30 μm

图2 不同切片厚度下多伞阿魏根的显微观察

Fig. 2 Microscopic observation of *F. ferulaeoides* roots at different section thicknesses

2.4.3 包埋剂 包埋剂对切片的完整度和显微效果无明显影响,主要影响伸卷度,见表4。OCT包埋剂易使切片卷片,胶水和胶水-水(2:1)切片伸卷度无太大差异,但胶水黏度太大增加了操作难度,故选择胶水-水(2:1)作为包埋剂。

表4 多伞阿魏不同器官冰冻切片的包埋剂筛选

Table 4 Screening of embedding agent for frozen sections of different organs of *F. ferulaeoides*

包埋剂	伸卷度			
	根	茎	叶柄	叶
OCT	-	-	-	-
胶水	+	+	+	+
胶水-水(2:1)	+	+	+	+

2.4.4 冷冻方式和温度 冷冻方式和温度对切片完整度有较大影响,其中液氮速冻20 s后于-25 $^{\circ}\text{C}$ 回温30 min效果最好。切片温度亦是影响切片完整度的1个因素,-20 $^{\circ}\text{C}$ 下切片效果较好,见表5。

表5 多伞阿魏不同器官冰冻切片冷冻方式、温度和切片温度筛选

Table 5 Screening of freezing method, freezing temperature and sectioning temperature for frozen sections of different organs of *F. ferulaeoides*

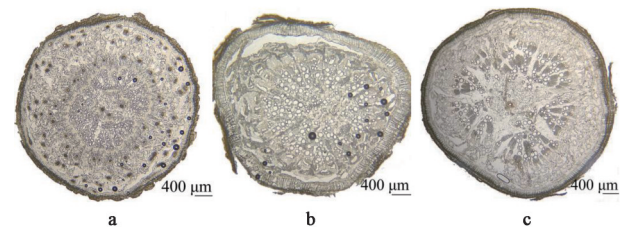
冷冻方式	冷冻温度/ $^{\circ}\text{C}$	切片温度/ $^{\circ}\text{C}$	完整度			
			根	茎	叶柄	叶
直接冷冻	-20	-20	-	-	-	-
		-25	--	--	--	--
	-20	+	+	+	+	
液氮速冻	-25(回温)	-25	-	-	-	-
		-20	++	++	++	++

2.4.5 后处理方式 不经过后冲洗步骤,切片的清晰度较差;当用无水乙醇冲洗后,切片的完整度有一定程度的降低;当经过相同质量分数蔗糖的PBS冲洗后切片的完整度和清晰度综合效果较好,见表6。根经过3种溶液后冲洗的切片见图3。处理好的切片直接置于室温下会有一定程度的破裂,考虑到温差的影响,将切片置于冰袋上一段时间后再置于室温逐步回温效果较好,见表7。

表6 多伞阿魏不同器官冰冻切片的后冲洗方式筛选

Table 6 Screening of post-rinsing method for frozen sections of different organs of *F. ferulaeoides*

后冲洗	完整度				清晰度			
	根	茎	叶柄	叶	根	茎	叶柄	叶
不冲洗	++	++	++	++	-	-	-	-
无水乙醇	-	-	-	-	+	+	+	+
相同质量分数蔗糖的PBS	+	+	+	+	+	+	+	+



注: a. 不冲洗; b. 无水乙醇冲洗; c. 相同质量分数蔗糖的PBS冲洗

图3 多伞阿魏根经3种溶液后冲洗的显微观察

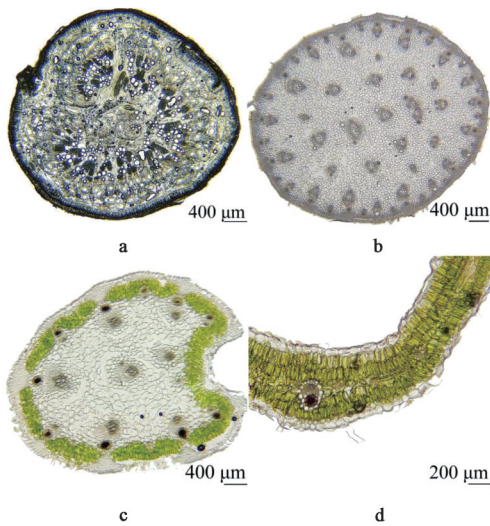
Fig. 3 Microscopic observation of *F. ferulaeoides* roots after being rinsed with three solutions

表7 多伞阿魏不同器官冰冻切片的切片放置环境筛选

Table 7 Screening of section placement environment for frozen sections of different organs of *F. ferulaeoides*

切片放置环境	完整度			
	根	茎	叶柄	叶
常温	--	--	--	--
冰袋上逐步回温	++	++	++	++

综上所述,多伞阿魏根、茎、叶柄和叶冰冻切片的最佳条件为根以10%、15%、20%梯度质量分数蔗糖作为保护剂,茎和叶柄以10%、20%、30%梯度质量分数蔗糖作为保护剂,叶以20%、25%、30%梯度质量分数蔗糖作为保护剂;以胶水-水(2:1)为包埋剂;液氮速冻20 s后于-25℃回温30 min; -20℃下切片,切片厚度25 μm;贴片后用与保护剂相同质量分数的蔗糖PBS冲洗;再将切片于冰袋上放置一段时间后置于常温条件下保存。见图4。

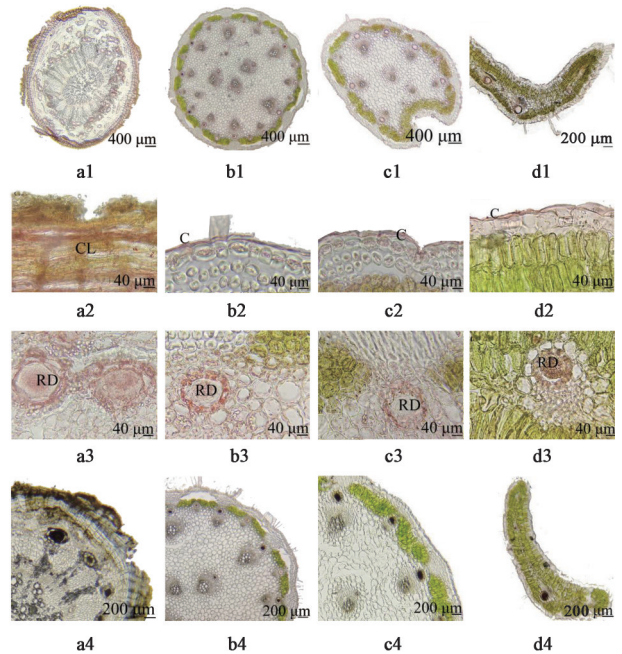


注:a.根;b.茎;c.叶柄;d.叶

图4 最适条件下多伞阿魏4种器官冰冻切片的显微观察
Fig. 4 Microscopic observation of frozen sections of four organs of *F. ferulaeoides* under optimum conditions

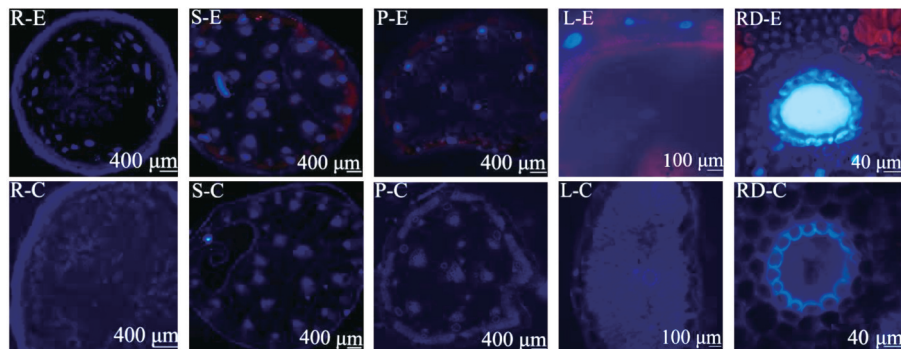
2.4.6 挥发油和香豆素类成分的分布 经苏丹IV染色后,>30 s时切片上残余染色剂较多,难浸洗干净;<30 s时染色效果不佳,故选择染色时间为30 s。由图5可知,多伞阿魏根的木栓层、树脂道被染红,

表明挥发油存在于以上组织中。显微结果显示,实验组根的木栓层、树脂道和导管显蓝色荧光,茎的表皮、树脂道和导管显蓝色荧光,叶柄的表皮、树脂道和导管显蓝色荧光,叶的树脂道显蓝色荧光;而用无水乙醇处理后,空白组根、茎、叶柄和叶树脂道处荧光均消失,表明香豆素类主要分布于树脂道中;见图6。



注:a.根;a1.染色全图;a2.树脂道;a3.木栓层;a4.空白组;b.茎;b1.染色全图;b2.树脂道;b3.角质层;b4.空白组;c.叶柄;c1.染色全图;c2.树脂道;c3.角质层;c4.空白组;d.叶;d1.染色全图;d2.树脂道;d3.角质层;d4.空白组;RD.树脂道;CL.木栓层;C.角质层

图5 多伞阿魏4种器官中挥发油苏丹IV染色的显微观察
Fig. 5 Microscopic observation of volatile oil in four organs of *F. ferulaeoides* stained with Sudan IV



注:R.根;S.茎;P.叶柄;L.叶;RD.树脂道;E.实验组;C.空白组

图6 多伞阿魏4种器官中香豆素类成分的荧光显微观察
Fig. 6 Fluorescence microscopy of coumarins in four organs of *F. ferulaeoides*

3 讨论

本研究采用冰冻切片技术对多伞阿魏根、茎、

叶柄、叶中的挥发油和香豆素类成分进行组织化学定位研究,改良了蔗糖保护-液氮速冻切片法^[12-13],

建立了多伞阿魏冰冻切片方法,除筛选了蔗糖质量分数、包埋剂种类、切片厚度等因素外^[7,19-20],还考察了后冲洗溶液和切片放置环境等对切片质量的影响,增加了成片率。同时,除蔗糖质量分数外,4种器官的最适条件均一致,与铁皮石斛和蝴蝶兰等研究相比,减少了制片步骤和时间,明显提高了制片效率^[12-13]。此外,本实验选择了胶水-水(2:1)作为包埋剂,与OCT包埋剂相比更为经济和简便。

挥发油和香豆素是药用植物中重要的活性成分,已有组织化学定位研究表明,药用植物中挥发油主要分布于油室^[8]、分泌腔^[21]和分泌道中^[22-23],香豆素类成分主要分布在分泌腔^[15]和分泌道中^[9,16]。本文研究结果显示,挥发油和香豆素类成分在多伞阿魏4种器官中均有分布,但主要分布于树脂道中。综上分析,植物分泌构造可能是挥发油和香豆素类成分积累和分布的场所,可为研究其他植物中上述2种成分的分布与分泌结构的关系提供有益借鉴。然而,本实验亦存在一些不足之处。苏丹IV染色结果显示,挥发油除在树脂道分布外还存在于根的木栓层及茎、叶柄、叶的角质层,而苏丹红类染色剂是一类人工合成的亲脂性偶氮化合物,使挥发油染色的同时亦可将植物细胞中其他脂肪类物质染色,如植物角质和栓质等^[24-25]。因此,建议后续可结合荧光显微镜技术更加准确定位挥发油积累部位;树脂道的分布和数量可作为评价香豆素类成分含量的重要指标^[9],进一步研究多伞阿魏不同器官中树脂道分布、数量与挥发油、香豆素类成分积累部位、含量之间的相关性。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 杨秀伟. 阿魏属药用植物的物质基础[J]. 中国现代中药, 2018, 20(2): 123-144.
[2] 刘涛. 伞形科两种植物化学成分和药理活性研究[D]. 上海: 复旦大学, 2013.
[3] 刘静. 多伞阿魏的化学成分及质量控制方法研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2019.
[4] 雷林洁, 滕亮, 赵欣, 等. 多伞阿魏挥发油提取工艺及化学成分研究[J]. 中成药, 2013, 35(6): 1251-1256.
[5] 杨明翰, 唐代萍, 盛萍. 多伞阿魏的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(16): 2031-2041.
[6] 宋军娜, 侯芳洁, 王乾, 等. 组织化学技术法分析祁白芷根中香豆素类成分的积累部位[J]. 广州化工, 2017, 45(8): 132-134.
[7] 王心可, 郭庆梅. 冰冻切片技术在高等植物中的应用

[J]. 植物生理学报, 2021, 57(5): 1047-1054.
[8] 陈玉莹, 张咏梅, 王生艳, 等. 冰冻切片结合荧光成像技术对当归根中挥发油的定位分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(1): 182-188.
[9] 李博园, 韩敏, 张明英, 等. 杭白芷根发育过程中香豆素类成分主要积累部位及含量变化研究[J]. 陕西农业科学, 2020, 66(7): 48-52.
[10] 盛萍, 唐代萍, 苗莉娟, 等. 不同产地多伞阿魏挥发油成分GC-MS指纹图谱研究[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(1): 30-37.
[11] 盛萍, 王飒, 苗莉娟, 等. 不同方法提取的多伞阿魏挥发油化学成分及其体外抗胃癌活性比较[J]. 中成药, 2013, 35(11): 2442-2448.
[12] 陆振芳, 蒋素华, 江敏, 等. 蝴蝶兰花器官冰冻切片技术探讨[J]. 河南农业大学学报, 2019, 53(2): 200-206.
[13] 蒋素华, 梁芳, 张燕, 等. 冰冻切片技术在铁皮石斛显微结构上的应用[J]. 植物研究, 2019, 39(4): 613-618.
[14] 秦玲. 补骨脂分泌结构及其与呋喃香豆素积累的相关性研究[D]. 西安: 西北大学, 2007.
[15] 张莹, 陈建伟, 徐建亚, 等. 明党参中香豆素成分的组织定位、分布和荧光相对定量研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3): 625-627.
[16] 兰志琼, 卢先明, 陈继兰, 等. 白芷根中香豆素类成分的组织化学定位研究[J]. 中国医药导报, 2011, 8(36): 66-68.
[17] KONARSKA A. Microstructural and histochemical characteristics of *Lycium barbarum* L. fruits used in folk herbal medicine and as functional food [J]. Protoplasma, 2018, 255(6): 1839-1854.
[18] CHEN X L, WANG Y, ZHAO H, et al. Localization and dynamic change of saponins in *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja [J]. PLoS One, 2019, 14(10): e223421.
[19] 陈丹, 赵洁. 适合于植物花器官的冰冻切片技术[J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(3): 285-290.
[20] 刘剑锋, 程云清, 阎秀峰, 等. 植物冰冻切片技术的改进[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2006, 30(3): 128-130.
[21] 白玫, 郑萍, 李合英, 等. 苦槛蓝营养器官的结构特征与有效成分积累关系研究[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(6): 104-110.
[22] 周亚福. 柴胡属6种药用植物结构与化学成分积累的比较和分泌道形态发生的研究[D]. 西安: 西北大学, 2008.
[23] 陈莹, 惠楠, 童珍珍. 白芷营养器官形态结构及其挥发油的组织化学定位[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(9): 2162-2164.
[24] 牛玉璐, 王卫东. 植物细胞壁的特化及其与组织功能的适应[J]. 生物学教学, 2012, 37(1): 4-5.
[25] 张霞, 胡露洁, 周存宇, 等. 植物细胞壁组织化学定位染色方法和技术的比较研究[J]. 植物研究, 2017, 37(1): 147-154.

[责任编辑 刘德文]