

不同染料标识木栓细胞壁中木栓脂的分布

张 宝¹,陈冰炜¹,翟胜丞^{1,2*},潘 虹¹,魏建强¹,勇 强^{2,3}

(1.南京林业大学 材料科学与工程学院,江苏 南京 210037;2.南京林业大学 林业资源高效加工利用协同创新中心,江苏 南京 210037;
3.南京林业大学 化学工程学院,江苏 南京 210037)

摘要:以日本晚樱(*Cerasus serrulata*)为试验对象,取其新鲜树皮经固定、脱水、不同树脂包埋、切片,使用甲苯胺蓝、盐酸-间苯三酚、苏丹Ⅲ、苏丹红7B、硫酸氢黄连素-苯胺蓝5种染色对切片进行染色,研究木栓细胞中木栓脂的分布。结果表明:1)经不同染料染色后在明场下观察,苏丹Ⅲ的染色效果最好,可直接将木栓脂染成红色。结合甲苯胺蓝、苏丹红7B和盐酸-间苯三酚染色观察,均可确定木栓脂主要存在于木栓细胞壁的最外层。2)甲苯胺蓝可抑制木质素自发荧光,避免木质素自发荧光的干扰,直接观察到木栓脂的荧光。3)硫酸氢黄连素-苯胺蓝染色后,木栓脂的荧光在木栓细胞壁外侧呈灰绿色,木质素的荧光在木栓细胞壁的内侧呈黄绿色。4)盐酸-间苯三酚染色后,木栓细胞壁内侧富含木质素的壁层被染为红棕色,且环氧树脂包埋会降低盐酸-间苯三酚的染色效果。

关键词:日本晚樱;木栓脂;染料;荧光;分布

中图分类号:S781 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2021)02-0208-05

Distribution of Suberin in the Phellem Cells Determined by Different Dyes

ZHANG Bao¹,CHEN Bing-wei¹,ZHAI Sheng-cheng^{1,2*},PAN Biao¹,WEI Jian-qiang¹,YONG Qiang^{2,3}

(1. College of Materials Science and Engineering Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China;

2. Co-Innovation Center of Efficient Processing and Utilization of Forest Resources, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 3. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: In this paper, the fresh bark of *Cerasus serrulata* was collected, fixed with FAA solution, dehydrated, resin embedded and sliced. Then the sections were stained with toluidine blue, hydrochloric acid-resorcinol, Sudan III, Sudan red 7B, Berberine hemisulfate salt-aniline blue to study the distribution of suberin in phellem's cell wall. The results showed that 1) after dyed and observed in bright field, Sudan III had the best dyeing effect, and it could directly dye the suberin red. Simultaneously, toluidine blue O, Sudan red 7B and hydrochloric acid-resorcinol staining confirmed that the suberin was mainly present in the outermost layer of the phellem cell wall. 2) Toluidine blue O could inhibit the auto-fluorescence of lignin, avoid the interference of the auto-fluorescence of lignin, and directly observe the fluorescence of suberin. 3) After berberine bisulfate-aniline blue stained, the fluorescence of the suberin was gray-green outside the phellem cell wall, and the fluorescence of lignin was yellow-green on the inside of the phellem cell wall. 4) After hydrochloric acid-resorcinol stained, the lignin inside the phellem cell wall appeared reddish brown, and the epoxy resin embedding could reduce the staining effect of hydrochloric acid-resorcinol.

Key words:*Cerasus serrulata*; suberin; dye; fluorescence; distribution

收稿日期:2020-06-17 修回日期:2020-06-29

基金项目:国家自然科学基金(31400496);江苏省自然科学基金(BK20140981)。

作者简介:张 宝,硕士在读。研究方向:木材形成与细胞壁超微构造。E-mail:njfuzhangb@163.com

*通信作者:翟胜丞,副教授,博士。研究方向:木材解剖学、有机质文物保护与保护。E-mail:zhais@njfu.edu.cn

木栓细胞(phellem cell),即软木细胞(cork)^[1],其细胞壁主要成分为木栓脂(suberin)、木质素(lignin)、多糖(polysaccharide)等高分子聚合物^[2-3];如栓皮栎软木中木栓脂的质量分数约40%^[4-5]。木栓脂化学性质比较稳定,具有较好的耐腐性和耐老化性。目前软木的主要应用是通过与其他材料复合以制备板材,可赋予板材一定吸振、吸声的功能,可满足公共场所和家庭场所的减噪需求^[6];木栓脂可通过己酸胆碱催化解聚以最大程度的保留木栓脂的分子完整性、进而加工制成具有一定程度的抗菌性、防水性的薄膜,具有良好的应用前景^[11]。

木栓脂化学结构与木质素有较大不同,因此可通过不同染料对于化学组分的特异性染色来进行区分。染色对观察生物材料的组织结构、化学组分分布等至关重要,将生物材料进行染色,可以对细胞或细胞壁中的某特定化学物质进行染色,以观察该化学物质在细胞或细胞壁中的分布。如K.Kobayashi等^[7]使用甲苯胺蓝对日本晚樱栓质化细胞进行染色,观察到木质素主要存在于栓质化细胞的细胞壁内侧部分。

根据前人研究,植物细胞染色常用染料有甲苯胺蓝^[7]、硫酸氢黄连素^[8]、番红O、固绿^[9]、苏丹类染料^[10]、间苯三酚显色反应^[11-12]等,适用于木质化或者栓质化细胞的染色^[13],但是如何区分细胞壁层中木质化和栓质化部分,仍有待摸索。日本晚樱树皮中的木栓细胞具有较好的柔韧性,且细胞在弦向可伸长至原始尺寸的2到3倍^[7]。本研究采用了苏丹Ⅲ染色法、苏丹红7B染色法、甲苯胺蓝染色法、硫酸氢黄连素-苯胺蓝对染法和盐酸-间苯三酚染色法五种染色方法对日本晚樱树皮切片进行染色,采用光学显微镜(含荧光显微镜)进行观察,确定木栓细胞在树木周皮中的分布及木栓脂在木栓细胞不同壁层的分布。通过比较不同染色方法,开展日本晚樱(*Cerasus serrulata*)树皮中栓质化细胞壁主要化学成分分布的研究,有助于后期进一步深入了解木栓细胞在植物生长过程中的形成及木栓脂堆积的过程,掌握周皮对植物保护作用的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

试验对象:日本晚樱树皮取自南京林业大学校园,从树干上取得尺寸为10 mm×10 mm×5 mm(L×T×R)的树皮。

染料:苏丹Ⅲ(Sudan Ⅲ,国药集团化学有限公司),苏丹红7B(Sudan Red 7B,国药集团化学有限公司),甲苯胺蓝O(Toluidine Blue O,上海阿拉丁

生化科技股份有限公司),苯胺蓝(Aniline Blue,上海阿拉丁生化科技股份有限公司),硫酸氢黄连素(Berberine Bisulfate,上海麦克林生化科技有限公司),间苯三酚(Phloroglucinol,上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

包埋剂:LR-white树脂(London Resin Company Ltd),环氧树脂Epon812(Epon812、NMA、DD-SA、DMP-30产自Structure Probe公司)。

其他:FAA固定液(磷酸二氢钠4.0 g,磷酸氢二钠6.5 g,37%甲醛100.0 mL,蒸馏水900.0 mL,浙江金华同和生物技术有限公司),盐酸(Hydrochloride,南京化学试剂股份有限公司),聚乙二醇200(上海灵峰化学试剂有限公司),丙三醇(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品包埋 环氧树脂Epon812包埋:样品饱水、戊二醛固定、PBS缓冲液调节pH、酒精梯度脱水、丙酮梯度脱酒精、配置树脂、样品包埋、树脂聚合(37℃,过夜;45℃,12 h;60℃,24 h)。

LR-white树脂包埋:样品饱水、配置树脂(向500 g树脂中加入9.9 g催化剂,避光混合均匀)、样品包埋(将饱水后的样品放入树脂中)、树脂聚合(在65℃烘箱中进行树脂聚合)。

1.2.2 切片制备 待日本晚樱树皮在FAA组织固定液中浸泡24 h后,将树皮修成1 mm×1 mm×3 mm的小样,分别采用LR-white树脂和Epon812环氧树脂进行包埋。包埋样品经单面刀修样后,使用半薄切片机(LEICA, RM2265)进行切片,切片厚度为3 μm。

1.2.3 染液配制及切片染色 本实验所用染料分别为甲苯胺蓝染液、苏丹红7B染液、硫酸氢黄连素染液、苯胺蓝染液、苏丹Ⅲ染液和间苯三酚染液,染液详细配制方法如表1所示。染液配制好后,按照表2中的染色步骤进行染色。染色后的切片,经漂洗浮色后,进行封片。封片剂为甘油水溶液。

1.2.4 切片观察 使用型号OLYMPUS,BX51荧光显微镜进行观察。蓝色激发光波长450~480 nm,拍照设备OPLENIC DIGITAL CAMEREA。

2 结果与分析

2.1 普通染料染色

分别采用甲苯胺蓝、盐酸-间苯三酚、苏丹Ⅲ和苏丹红7B对日本晚樱树皮经环氧树脂Epon812包埋后的切片进行染色,并采用光学显微镜进行观察,显微图像如图1所示。图1a为未染色显微图像,图中木栓细胞形态不规整,细胞间无细胞间隙,且相邻

细胞间的连接方式为搭接。图 1b 为盐酸-间苯三酚染色结果,间苯三酚在酸性条件下主要使木质化的细胞壁着色^[14],但在图中并未观察到木质素被染上颜色,这可能与包埋时所用树脂相关。图 1c 为苏丹Ⅲ染色结果,可观察到木栓细胞壁在染色后分为两个部分,木栓细胞壁远离细胞腔部分(即细胞壁外

侧)被染上红色,靠近细胞腔的细胞壁(即细胞壁内侧)仍为无色。苏丹Ⅲ为脂溶性染料,易溶于脂类物质可使脂类物质着色^[7],图 1d 为苏丹红 7B 染色结果,可以看到木栓细胞壁的内侧部分为无色,木栓细胞壁的外侧部分为紫红色,其染色结果与苏丹Ⅲ类似,可使木栓细胞细胞壁的木栓脂着色。

表 1 不同染料的配制方法

Table 1 Preparation of different dyes

染料	配制方法
0.05% (W/V) 甲苯胺蓝染料	取 0.01 g 甲苯胺蓝溶于 20 mL 蒸馏水中,混匀
0.1% (W/V) 苏丹红 7B 染料	10 mL 聚乙二醇 200 中加入 20 mg 苏丹红 7B 粉末,放入 90℃ 水浴锅中约 1 h,取出待其冷却,后加入 30 mL 丙三醇,在离心机里震荡,室温下保存,使用时取上层清液
0.1% (W/V) 硫酸氢黄连素染料	称取 0.02 g 硫酸氢黄连素加入 20 mL 蒸馏水,混匀后室温保存
0.5% (W/V) 苯胺蓝染料	20 mL 蒸馏水中加入 0.1 g 苯胺蓝粉末,混匀后室温保存
0.5% (W/V) 苏丹Ⅲ染料	在 20 mL 90% 乙醇中加入 0.1 g 苏丹Ⅲ粉末,使用离心机进行离心,室温下保存,使用时取上层清液
5% (W/V) 间苯三酚染料	将 1 g 间苯三酚粉末溶入 20 mL 90% 酒精中,震荡混匀

注:W/V 为质量浓度,单位为 g/mL;染料配制方法参照文献[10]。

表 2 5 种染色方法染色步骤

Table 2 Dyeing steps

染色方法	染色步骤
苏丹Ⅲ染色	取 0.5% 苏丹Ⅲ上清液 → 浸泡切片 7~10 min → 50% 酒精清洗浮色 → 封片
苏丹红 7B 染色	滴加染液 → 浸没切片 1 h → 蒸馏水清洗浮色 → 封片
硫酸氢黄连素-苯胺蓝对染染色	滴加硫酸氢黄连素 → 浸没切片 1 h → 蒸馏水清洗浮色 → 滴加苯胺蓝溶液 → 浸没切片 30 min → 蒸馏水清洗浮色 → 封片
甲苯胺蓝染色	滴加甲苯胺蓝 → 浸没切片 5~7 min → 蒸馏水清洗浮色 → 封片
盐酸-间苯三酚染色	滴加 37% 浓盐酸 → 浸没切片 3~5 min → 吸水纸吸取残余液体 → 滴加间苯三酚 → 浸没切片 5 min → 封片

2.2 荧光染料

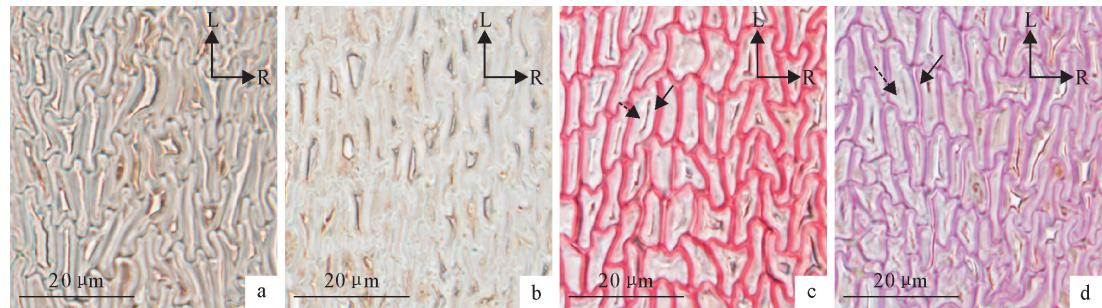
2.2.1 甲苯胺蓝染色 甲苯胺蓝作为染料既可以在明场下观察,也可以在荧光下观察。使用荧光显微镜观察未染色、甲苯胺蓝染色及硫酸氢黄连素染色效果,如图 2 所示。图 2a 为未染色切片在明场下的显微图片,可以看到径切面上木栓细胞形态不规整。图 2b 为未染色切片在蓝色激发光下的显微图片,图中木栓细胞荧光强度与颜色相差不大,较难区分木栓细胞壁的成分分布。图 2c 为甲苯胺蓝染色明场下显微图片木栓细胞壁的内侧染上蓝色,木栓细胞壁的外侧着色较浅至无色。图 2d 为甲苯胺蓝染色切片在荧光显微镜下的图片,与未染色切片在紫色激发光下观察比较,发现木质素的荧光消失,木栓脂的荧光变暗。甲苯胺蓝主要使细胞壁中木质素及多糖类物质着色^[7]。苏丹Ⅲ与苏丹红 7B 均为脂溶性染料,而木栓细胞中含有的脂类物质主要为木栓脂,因此苏丹Ⅲ染色后显红色的细胞壁为木栓脂。甲苯胺蓝、苏丹Ⅲ和苏丹红 7B 染色结果均表明木栓细胞壁的内侧部分主要成分为木质素和多糖,外侧部分主要成分为木栓脂。甲苯胺蓝染色后木质素与木栓脂的荧光均变暗,说明在蓝色激发光下甲苯

胺蓝可以抑制木质素和木栓脂的自发荧光^[15],表明甲苯胺蓝主要使木质素着色,也可使木栓脂着色但着色程度较浅。

2.2.2 硫酸氢黄连素-苯胺蓝对染法 硫酸氢黄连素-苯胺蓝对染法染色结果如图 3 所示,硫酸氢黄连素-苯胺蓝为荧光染色,在明场下(图 3a)较难分辨木栓脂和木质素不同。蓝色激发光下硫酸氢黄连素的染色结果(图 3b)发现,木栓细胞壁的内侧呈现为黄绿色,细胞壁的外侧呈现为灰绿色。硫酸氢黄连素-苯胺蓝染色后就染色效果与图 1b 中未染色相比,染色后木质素与木栓脂的荧光得到不同程度的增强,从而观察到木质素和木栓脂的分布。根据前人研究^[16]硫酸氢黄连素-苯胺蓝对染法中,硫酸氢黄连素主要使木栓脂的荧光增强;苯胺蓝可作为木质素自发荧光的抑制剂^[17],在激发光下可观察到木质素的自发荧光变暗。结合以上分析可知,硫酸氢黄连素-苯胺蓝对染色法,可在增强木栓脂的荧光同时,抑制木质素的自发荧光,从而在荧光显微镜下区分并确定木栓细胞壁木栓脂和木质素的分布。

2.3 盐酸-间苯三酚染色切片改良

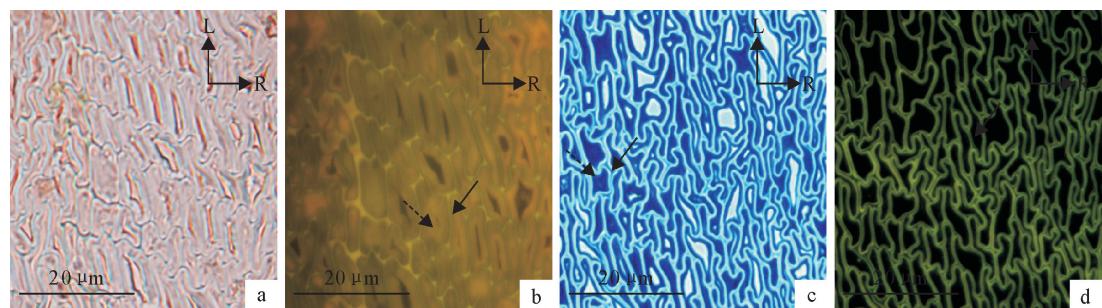
图 1b 为使用环氧树脂包埋后制作切片染色结



注:箭头:木质素,箭:木栓脂,标尺=20 μm。

图1 未染色(a)、盐酸-间苯三酚(b)、苏丹Ⅲ(c)、苏丹红7B(d)染色后的晚樱树皮显微图像

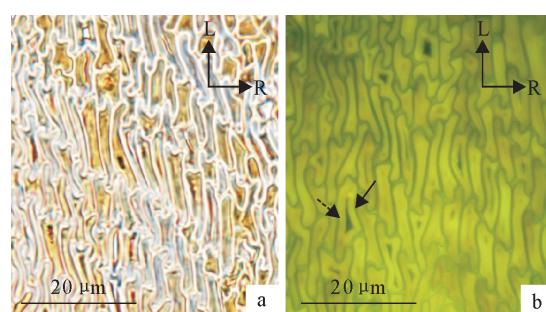
Fig. 1 Microscopic image of bark of *Cerasus serrulata* after dyeing with toluidine blue



注:a为未染色,b为未染色切片在蓝色激发光下的显微图片,c为甲苯胺蓝染色,d为甲苯胺蓝染色切片在蓝色激发光下的显微图片,箭头:木质素,箭:木栓脂,标尺=20 μm。

图2 未染色,甲苯胺蓝染色及其在蓝色激发光下的荧光图

Fig. 2 Unstained, toluidine blue stained and its fluorescence image under blue excitation light



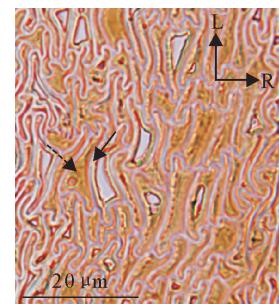
注:a为染色后明场下显微图片,b为染色后蓝色激发光下的显微图片,箭头:木质素,箭:木栓脂,标尺=20 μm。

图3 硫酸氢黄连素-苯胺蓝染色图

Fig. 3 Berberine sulfate-aniline blue dyed image

果,其染色效果较差。为探究不同包埋树脂对染色效果的影响,根据间苯三酚的化学性质,选用亲水性树脂LR-white树脂对日本晚樱树皮进行包埋,切片后再次染色。发现图4中木栓细胞细胞壁内侧被染上了红棕色,间苯三酚在酸性条件下主要使木质素着色,由此可知木栓细胞壁的内侧主要成分为木质素,这与前面的染色结果相互验证,也表明使用亲水性染料染色时,LR-white树脂包埋后切片的染色效果优于环氧树脂包埋染色效果。盐酸-间苯三酚染色法对环氧树脂和LR-white两种树脂包埋后的切片进行染色后,环氧树脂包埋后的切片仍为无色,而

LR-white树脂包埋后切片木栓细胞壁的内侧被染上樱红色,表明树脂对盐酸-间苯三酚染色有影响,主要原因因为LR-white树脂为亲水性树脂,且间苯三酚具有羟基,因此,间苯三酚更容易作用于切片使木质素着色。



注:箭头:木质素,箭:木栓脂,标尺=20 μm。

图4 LR-white树脂包埋后盐酸-间苯三酚染色

Fig. 4 Hydrochloric acid-resorcinol staining after LR-white resin embedded

3 结论

染色后在明场下观察,苏丹Ⅲ的染色效果最好,可以直接将木栓脂染成红色。同时结合甲苯胺蓝、苏丹红7B和盐酸-间苯三酚染色确定木栓脂主要存在于木栓细胞壁的最外层。

甲苯胺蓝可以抑制木质素的自发荧光，避免木质素的自发荧光的干扰，直接观察到木栓脂的荧光。

硫酸氢黄连素-苯胺蓝染色后，木栓脂的荧光在木栓细胞壁外侧呈灰绿色，木质素的荧光在木栓细胞壁的内侧呈黄绿色。

盐酸-间苯三酚染色后，木栓细胞壁内侧的木质素呈现为红棕色，且环氧树脂包埋会降低盐酸-间苯三酚的染色效果。

参考文献：

- [1] ANGYALOSSY V, PACE M R, EVERET R F, et al. IAWA List of Microscopic Bark Features[J]. IAWA Journal, 2016, 37(4): 517-615.
- [2] 韩雪源, 茅林春. 木栓脂组成成分、组织化学特性及其生物合成研究进展[J]. 植物学报, 2017, 52(3): 358-374.
HAN X Y, MAO L C. Research progress on composition, histochemical characteristics and biosynthesis of suberin[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2017, 52(3): 358-374. (in Chinese)
- [3] MIRANDA I, GOMINHO J, PEREIRA H. Cellular structure and chemical composition of cork from the Chinese cork oak (*Quercus variabilis*) [J]. Journal of Wood Science, 2013, 59(1): 1-9.
- [4] 张丽丛, 雷亚芳, 常宇婷. 栓皮栎软木主要化学成分的分析[J]. 西北林学院学报, 2009, 24(4): 163-165.
ZHANG L C, LEI Y F, CHANG Y T. Contents of the main chemical components of cork from *Quercus variabilis* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2009, 24(04): 163-165. (in Chinese)
- [5] 上官蔚蔚, 雷亚芳, 赵泾峰, 等. 栓皮栎软木性质及应用研究进展[J]. 西北林学院学报, 2017, 32(6): 282-287.
SHANGGUAN W W, LEI Y F, ZHAO J F, et al. Advances in the researches of basic properties and the application of cork from *Quercus suber* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2017, 32(6): 282-287. (in Chinese)
- [6] 赵戈, 段新芳, 宫恬, 等. 世界软木加工利用现状和我国软木工业发展对策[J]. 世界林业研究, 2004, 17(5): 25-28.
ZHAO G, DUAN X F, GUAN Y, et al. Situation of cork utili-
- zation in the world and the development countermeasure of the China's cork industry[J]. World Forestry Research, 2004, 17(5): 25-28. (in Chinese)
- [7] KOBAYASHI K, URA Y, KIMURA S, et al. Outstanding toughness of cherry bark achieved by helical spring structure of rigid cellulose fiber combined with flexible layers of lipid polymers[J]. Advanced Materials, 2018, 30(6): 1705315.
- [8] VIKTOR ŽÁRSKÝ, FATIMA CVRČKOVÁ. Plant cell morphogenesis; methods and protocols[M]. New York: Humana Press, 2014: 28-29.
- [9] 李兵, 李登弟, 张杰, 等. 植物树脂半薄切片染色方法的改进[J]. 植物生理学报, 2011, 47(12): 85-90.
LI B, LI D D, ZHANG J, et al. Modification of resin semithin section staining method in plant tissues[J]. Plant Physiology Journal, 2011, 47(12): 85-90. (in Chinese)
- [10] 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): 149-156.
ZHANG X, HU L J, ZHOU C Y, et al. Comparative study on staining methods and techniques of cell wall histochemistry [J]. Bulletin of Botanical Research, 2017, 37(1): 149-156. (in Chinese)
- [11] SIEGEL S M. On the biosynthesis of lignin[J]. Physio Plant, 1953(6): 134-139.
- [12] ZOË A. POPPER. The plant cell wall: methods and protocols [M]. New York: Humana Press, 2011.
- [13] 胡正海. 植物解剖学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010: 106-115.
- [14] 黄南平. 氮酮在植物染色中的应用[J]. 宜春学院学报, 1994(5): 62-64.
- [15] BIGGS A R. Detection of impervious tissue in tree bark with selective histochemistry and fluorescence microscopy[J]. Biotechnic & Histochemistry, 1985, 60(5): 299-304.
- [16] 薛雨源. 木质素的荧光行为及其荧光共振能量转移体系的构建[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
- [17] 徐建华, 陶冶, 黄艳, 等. 植物根内皮层凯氏带染色的小檗碱-苯胺蓝对染法[J]. 植物生理学报, 2004, 40(4): 479-482.
XU J H, TAO Y, HUANG Y, et al. A berberin-aniline blue counterstaining method for dyeing caspary band in root endodermis [J]. Plant Physiology Journal, 2004, 4(40): 479-482. (in Chinese)

(上接第 201 页)

- [10] 徐有明. 木材学[M]. 北京: 中国林业出版社, 2019: 185.
- [11] 尹思慈主编. 木材学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1996: 227-228.
- [12] 刘鹏, 姜笑梅, 张立非. 非洲热带木材[M]. 北京: 中国林业出版社, 2008.
- [13] 周海滨, 吕建雄, 徐伟涛. 我国结构用木材标准体系构建[J]. 木材工业, 2012, 26(3): 44-47.
ZHOU H B, LV J X, XU W T. Establishing a standard system for structural wood products in China[J]. China Wood Industry, 2012, 26(3): 44-47. (in Chinese)
- [14] 吴敏, 吴立勋, 汤玉喜, 等. 南方型黑杨无性系木材材性的研究[J]. 湖南林业科技, 2005, 32(4): 21-31.
[15] 潘彪, 王丰, 连彩萍, 等. 美洲黑杨新无性系主要物理力学性能研究[J]. 安徽农业大学报, 2014, 41(6): 928-933.
PAN B, WANG F, LIAN C P, et al. Physical and mechanical properties of new *Populus deltoides* clones[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2014, 41(6): 928-933. (in Chinese)
- [16] 陈柳晔, 史小娟, 樊军锋. 秦白杨系列品种木材材性及纤维形态的研究[J]. 西北林学院学报, 2017, 32(1): 253-258.
CHEN L H, SHI X J, FAN J F. Study on properties and fiber morphology of Qinbaiyang series varieties woods[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2017, 32(1): 253-258. (in Chinese)