doi: 10.3724/CBB-2026-0036

基于微距堆叠的低成本植物微形态高景深成像方法

常圣鑫[1], 罗佳怡[1], 何根云[2], 黄凯淇[1], 罗有辉[1], 韩伟[1], 林哲丽[1], 张朝玉[2], 李春霞[1*], 于白音[1*]

[1]韶关学院生物与农业学院, 广东省粤北食药资源利用与保护重点实验室, 韶关 512005

[2]南雄市乡村振兴服务中心, 韶关 512499

摘要 植物微形态是植物物种鉴定、功能性状解析及进化历程追溯的重要形态学依据。然而, 长期以来高质量微形态图像的获取受限于高昂的硬件设备和复杂的成像技术。近年来, 一种基于数码相机的微距堆叠技术在摄影爱好者中快速传播, 可低成本获取高景深、高分辨率的微距图像。受此技术启发, 根据植物微形态研究要求, 构建了一套经济高效的植物微形态成像方法。该方法包括植物样品采集与制备、微距成像系统组装、连续焦点序列拍摄、微距堆叠合成以及比例尺校准等步骤。测试结果表明, 在 5×–50×物镜下, 该方法的实测分辨率可达 0.87–2.46 μm, 可稳定获取植物表皮细胞轮廓、毛状体形态、花粉外壁主纹饰及种子表面雕纹等微米级结构的高质量微距堆叠图像。由于该方法所需硬件成本较低, 操作灵活, 特别适合中小型植物学实验室的形态与分类学研究, 也可应用于植物学教学及科普工作。

关键词 植物微形态学, 微距堆叠, 低成本成像

常圣鑫, 罗佳怡, 何根云, 黄凯淇, 罗有辉, 韩伟, 林哲丽, 张朝玉, 李春霞, 于白音 (2026). 基于微距堆叠的低成本植物微形态高景深成像方法. 植物学报 **61**, 1–14.

景深是指在一张图像中, 沿光轴方向能够呈现清晰图像的空间深度范围。在微距拍摄中, 随着放大倍数的增加, 景深会急剧减小。以传统体视显微镜为例, 在 10×–20×低倍观察条件下, 景深通常可达毫米级; 当放大倍数提高至 50×时, 景深迅速下降至亚毫米级。此外, 在采用较高数值孔径(NA)的光学配置时, 即使在相同放大倍数下, 景深仍可能进一步降低至约 0.1 mm 量级。因此, 传统单帧成像方法难以在一幅图像中完整展现样品的精细立体结构。为解决这一问题, 微距堆叠技术应运而生。该技术通过融合不同焦平面的多张图像, 能实现样品形态的全景深合成(Johnson, 2008)。

目前, 一些高端显微系统(如蔡司 Axio Zoom.V16、蔡司 Axio Imager 系列以及基恩士 VHX-7000/6000 数字显微镜)已内置自动微距堆叠模块, 通过精密电动 z 轴控制与集成处理软件可实现扩展景深成像。然而, 此类系统价格昂贵, 维护成本高、操作专业性强, 仅少数大型研究机构、高等院校和工业检测实验室有条件部署。此外, 高端显微镜硬件配置相对固定, 对样本大小和成像环境限制较大。

近年来, 国内外微距摄影爱好者开发了一种低成本微距堆叠成像方法。将数码相机与微距镜头或工业显微镜物镜固定在精密导轨上, 利用步进控制技术在不同焦平面连续拍摄图像序列, 再通过堆叠软件合成高分辨率、全焦点的显微图像。国外有研究者已经注意到该技术, 并成功将其应用于昆虫形态学研究(Akbarzadeh et al., 2015; Floriano and Rodrigues, 2016)以及博物馆动物标本的数字化工作(Mertens et al., 2017; Braker, 2022)。在植物学研究领域, Saunders 等(2024)采用微距堆叠技术对白花菜科(Cleomaceae) 218 个物种的种子进行微距堆叠成像, 结合化石记录和分子系统发育证据进行比较分析, 阐明了该科植物的起源和进化历史。除此之外, 该技术在植物表皮形态、花器官细微附属物等表面微细结构研究中应用较少, 该技术在不同植物类群中的适用性及其标准化成像流程仍缺乏系统评估。

鉴于此, 本研究基于现有微距堆叠成像技术, 并结合植物微形态研究的实际需求, 构建了一套低成本、半自动化的植物微形态成像方法(图 1)。我们以植物毛状体、气孔、花粉及孢子等多种典型微形态结构为测试对象, 评估了该方法在植物形态学研究中的适用性和潜在应用范围, 测试了针对不同植物器官和组织研究的软硬件配置, 并提出了微距堆叠图像比例尺的添加方法。

收稿日期: 2026-02-06; 接受日期: 2026-05-11

基金项目: 韶关市科技局科技计划(No.220607104530687)、 韶关学院博士科研启动金(No.9900064504)和韶关学院横向项目(No.2025-59, No.2026-5)

* 通讯作者。E-mail: LeeOlivia2015@outlook.com; 540391135@qq.com

 © 植物学报 Chinese Bulletin of Botany

1 材料与方法

1.1 植物样品采集与制备

为避免人为处理影响样品表面结构，建议优先采集干净样品。如需进行表面清洁，可以用蒸馏水轻轻冲洗以去除表面杂质。阴干表面水分后在体视显微镜下用超细尖头镊子清理顽固杂质。为获取新鲜不粘连花药，可先将开裂花药置于防潮箱 1 天以降低花粉湿度。为获取干净新鲜的蕨类孢子，可将带有成熟孢子囊的叶片置于 LED 灯下，利用 LED 灯散热加速孢子囊环带失水以释放孢子。

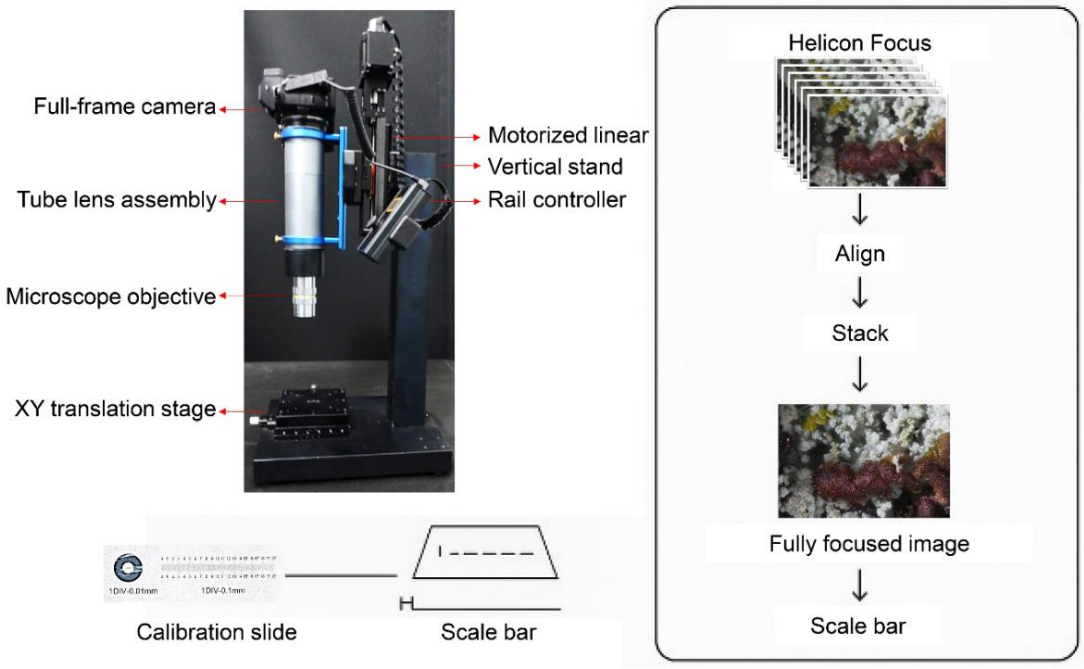


图 1 微距堆叠成像技术流程

左图为微距堆叠主系统，包括全画幅数码相机、无限远管镜组、物镜、电动线性导轨、垂直支架和导轨控制器，可实现高精度连续焦点拍摄。右图为图像处理流程，利用 Helicon Focus 软件对不同焦平面拍摄的多张图像进行对齐和融合，生成完全对焦的合成图像，随后添加比例尺以指示样本大小。

Figure 1 Schematic workflow of the macro focus stacking process

The left panel shows the primary stacking system, which consists of a full-frame digital camera, a tube-lens assembly, a microscope objective, a motorized linear rail, a vertical support stand, and a motion controller, enabling high-precision automated macro focus stacking. The right panel illustrates the image-processing workflow, multiple images captured at different focal planes are aligned and merged using Helicon Focus to generate a fully in-focus composite image, after which a scale bar is added to indicate specimen size.

1.2 微距成像系统组件与组装

1.2.1 光学组件

微距成像系统的光学组件包括数码相机、无限远管镜组和物镜。

(1) 数码相机: 配备尼康 Z5 全画幅微单数码相机(传感器尺寸 35.9×23.9 mm, 2 430 万像素; 二手价格 4 000–5 000 元)。

(2) 无限远管镜组: 配备 Raynox DCR-150 近摄透镜(焦距 208 mm), 将物镜平行光输出并传输至相机传感器。透镜安装在两件式机械组件内，该组件包括: 外部支撑管，用于将透镜固定在设计的光学距离处; 内部涂黑的延长管，可有效抑制杂散光。无限远管镜组价格 1 500 元。

(3) 物镜: 配备无限远校正三丰 M Plan Apo 物镜(∞/0，设计镜筒长度 f=200 mm; 二手价格 1 500–6 000 元) (表 1)。

© 植物学报 Chinese Bulletin of Botany

表 1 用于植物微形态成像的三丰 M Plan Apo 物镜规格

Table 1 Specifications of Mitutoyo M Plan Apo objectives used for microstructure imaging

Magnification (×)	Numerical aperture (NA)	Theoretical resolution (μm)	Measured system resolution (μm)	Field of view (mm)	Working distance (mm)	Typical applications
5	0.14	2.40	2.46	7.2×4.8	34	Plant small organs and anatomical structures
10	0.28	1.20	1.74	3.6×2.4	34	Small seeds and hairy bodies
20	0.42	0.80	1.23	1.8×1.2	20	Pollen and spores
50	0.55	0.61	0.87	0.7×0.5	13	Crystallization of plant epidermis and texture of pollen walls

数值孔径(NA)表示物镜的聚光能力和分辨能力。理论分辨率基于 Abbe 衍射极限(d=0.61λ/NA)进行估算，其中波长(λ)取 550 nm。系统实测分辨率表示完整成像系统的有效分辨率，采用 USAF 1951 分辨率板进行测定，通过识别各放大倍数下可分辨的最小线对，综合反映物镜、镜筒透镜、相机传感器及采样条件等因素的影响。工作距离为物镜前透镜至样品在合焦状态下的距离。视场为基于全画幅相机传感器及镜筒透镜配置估算的成像范围(水平×垂直)。

Numerical aperture (NA) indicates the light-gathering ability and resolving power of the objective. Theoretical resolution was estimated based on the Abbe diffraction limit (*d=0.61λ/NA*), assuming a wavelength (*λ*) of 550 nm. Measured system resolution represents the effective resolution of the complete imaging system and was determined using a USAF 1951 resolution target by identifying the smallest resolvable line pairs under each magnification, incorporating the combined effects of the objective, tube lens, camera sensor, and sampling conditions. Working distance is the distance between the front lens of the objective and the specimen when in focus. Field of view is the approximate imaging area (horizontal × vertical) estimated based on the full-frame camera sensor and tube lens configuration.

1.2.2 机械组件

配备具有超高稳定性的成像系统基座，基座上安装二维精控样品台(台面长宽 100 mm × 100 mm，X、Y 方向行程均为 34 mm)，以实现样品准确定位；安装立柱、电动线性组件和控制器，以实现 z 轴精确控制(步长调节范围 0.62 μm–1 mm，重复定位精度±0.003 mm)，用于连续、高精度图像采集。机械组件总价 1 500 元。

1.2.3 照明组件

配备 LED 灯(色温 6 000K，功率 12W)对样品进行照明，以增强表面立体感。选配柔光扩散器(如柔光纸或柔光球)以减少眩光和照明不均。

1.2.4 组件组装

通过金属适配器将相机安装在无限远管镜组上部，将物镜螺旋固定在无限远管镜组下部，确保同轴对准和稳定性。将整个光学组件安装在电动 z 轴平台上以实现精确垂直移动。将照明装置布置于二维载物台周围或上方。

1.3 连续焦点序列拍摄

1.3.1 样品定位

使用夹子或蓝丁胶将样品固定于光学组件正下方载物台。根据研究需要选择合适物镜(表 1)。使用控制器调节电动 z 轴，使物镜和样品间距处于工作距离。通过相机屏幕观察样品，微调 z 轴至样品清晰，手动或通过载物台调节样品位置使待观测区域位于初始微距范围内。对于高倍率成像，先在低倍物镜下检查样品结构完整性、方向和固定情况，再更换高倍物镜成像。

1.3.2 照明调节

调节 LED 灯光照明方向和亮度，调整柔光装置位置，确保样品表面亮度均匀，无明显眩光和阴影。

1.3.3 相机设置与图像采集

将相机拍摄模式设置为手动模式，固定 ISO(100)和快门速度(1/20 秒)，设置 RAW 或 TIFF 拍摄格式。通过 z 轴控制器设置拍摄焦点起始位置、终止位置和步长。启动拍摄程序，采集覆盖整个研究目标区域的连续焦点序列图像。

1.4 微距堆叠合成

1.4.1 图像导入

将沿 z 轴拍摄的序列图像导入 Helicon Focus 软件(https://www.heliconsoft.com/heliconsoft-products/helicon-focus/，高级版终身授权费 2 000 元)。

1.4.2 堆叠方法

Helicon Focus 软件提供 3 种堆叠方法，分别适用于不同类型样本和成像需求。

(1) 加权平均法：计算每个 xy 位置像素的加权平均值，生成过渡平滑图像。该方法适用于深度变化平缓的样品，如相对扁平的叶片或表面纹理连续的微结构。其参数有“半径/平滑度”，用于控制像素混合范围，数值越大过渡越平滑，但可能导致精细细节轻微模糊。

(2) 深度图法：保留每个 xy 位置最清晰的像素，突出三维表面特征。该方法适用于具有明显形貌特征的样品，如毛状体、花粉粒或弯曲的叶面。其参数包括“半径/平滑度”和“增强边缘/对比度增强”，前者用于控制边缘平滑度，后者可突出微观结构轮廓，但若过度使用可能会引入伪影。

(3) 金字塔法：采用多尺度算法，分别处理不同尺寸的特征，平衡大尺度结构和精细细节。该方法适用于同时包含宏观和微观结构的样品，如带毛状体的叶片或花器官。其参数包括“层级/金字塔深度”和“半径/滑度”，前者用于控制多尺度层数，后者用于调整细节混合和边缘平滑度。

1.4.3 对齐与附加设置

启用自动对齐功能以校正样品可能存在的轻微位移。应用其它选项，如光晕减少、边缘平滑和适度对比度增强，以提高整体图像质量。

1.4.4 导出

将堆叠后的图像导出为 TIFF 或高分辨率 JPEG 格式。

1.5 比例尺校准

配备显微用校准玻片(1 格= 0.1 mm 和 1 格= 0.01 mm)。采用与样品成像相同的镜筒透镜、物镜和相机设置，调节 z 轴使刻度对焦清晰，拍摄校准玻片刻度区图像。使用 Helicon Focus 软件或其它后期处理软件(如 Photoshop、ImageJ)测量已知距离对应的像素数，计算像素-微米比，并将该比例应用于比例尺添加或样品测定。

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 微小种子成像

在 10×和 20×物镜下，微距堆叠成像系统可对大小仅 0.3–2 mm 的微小种子进行高质量成像，能清晰展示种子的形状、颜色及种皮表皮细胞排列方式(图 2)。测试结果显示，秋海棠(*Begonia grandis*)未成熟种子呈纺锤形，种皮细胞薄而透明(图 2A)；烟草(*Nicotiana tabacum*)新成熟种子的种皮细胞呈浅棕色、半透明且略微凸起(图 2B)；黑果越橘(*Vaccinium myrtillus*)种子呈广卵形、浅棕色，种皮表面具有不规则凹陷和褶皱结构，凹陷区域可见表皮的薄膜状残留(图 2C)；马松子(*Melochia corchorifolia*)种子表面粗糙，具黑白相间条块，高倍放大下可见明显的纵向带状结构(图 2D)。

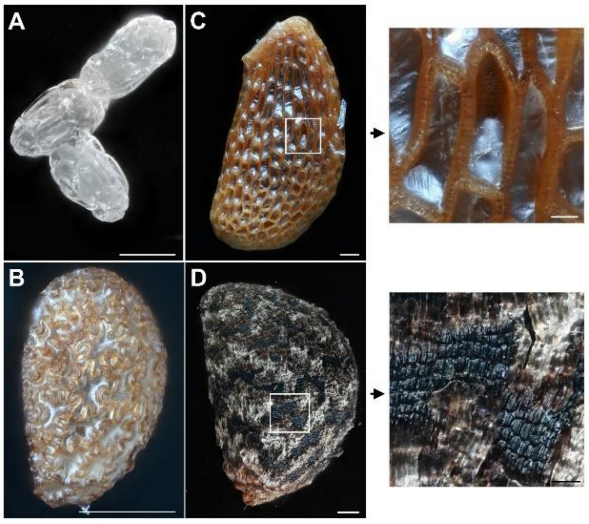


图 2 小种子显微成像

(A) 秋海棠未成熟种子；**(B)** 烟草新成熟种子；**(C)** 黑果越橘新成熟种子；**(D)** 马松子新成熟种子。主图 Bars=200 μm；放大图 Bars=50 μm。**(A)**、**(C)**和**(D)**采用 10×物镜成像，**(B)**采用 20×物镜成像。图像经不同程度的数字放大和裁剪处理后呈现。

© 植物学报 Chinese Bulletin of Botany

Figure 2 Microscopic imaging of small seeds
(A) *Begonia grandis* immature seed; **(B)** *Nicotiana tabacum* newly matured seed; **(C)** *Vaccinium myrtillus* newly mature seed; **(D)** *Melochia corchorifolia* mature seed. Main images, Bars=200 μm; insets, Bars=50 μm. Panels **(A)**, **(C)**, and **(D)** were imaged using a 10× objective lens, whereas panel **(B)** was imaged using a 20× objective lens. Images were digitally magnified and cropped to varying degrees for presentation purposes.

2.1.2 微小器官成像

在 5×–50×物镜下，微距堆叠成像系统可对毫米级植物器官进行多尺度高质量成像(图 3)。测试结果显示，5×物镜下可见海金沙(*Lygodium japonicum*)小叶叶裂末端着生的孢子囊穗(图 3A)；50×物镜下可见孢子囊顶端附属结构(图 3B)。用镊子和微针将近成熟的孢子囊解剖离体后，在 20×物镜下，可见孢子囊中部膨大，顶部具环带，透过孢子囊壁可见内部橙色孢子(图 3C)；孢子囊成熟后，20×物镜下即可见破裂环带以及释放出的孢子(图 3D)。

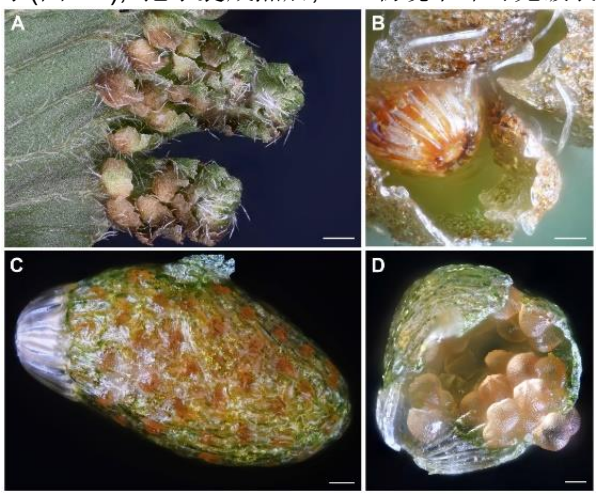
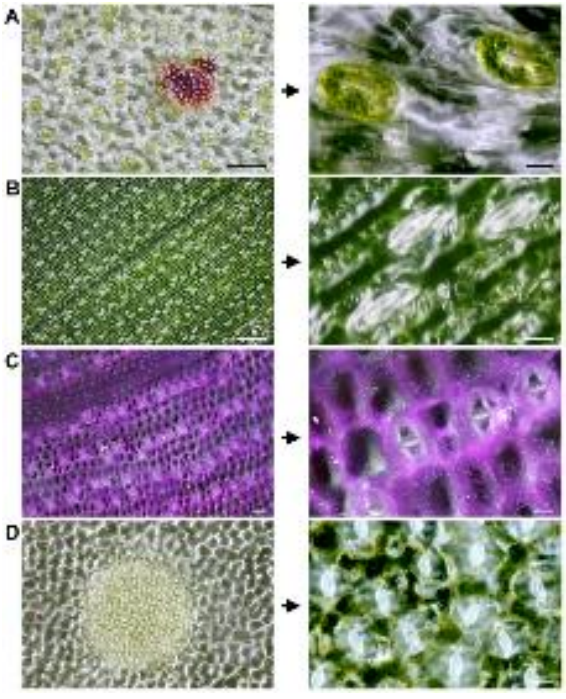


图 3 海金沙孢子囊群和孢子囊
(A) 叶边缘生出的孢子囊群(Bar=400 μm)；**(B)** 从小孢子叶延伸出的幼嫩孢子囊顶部结构(Bar=50 μm)；**(C)** 近成熟孢子囊，顶部具环带(Bar=100 μm)；**(D)** 环带破裂释放孢子的成熟孢子囊(Bar=50 μm)。**(A)**、**(B)**、**(C)**和**(D)**图分别采用 5×、50×、20×、20×物镜成像。
Figure 3 Sporangia and sori of *Lygodium japonicum*
(A) Sori emerging from the leaf margin (Bar=400 μm); **(B)** Apex of a young sporangium extending from the sporophyll (Bar=50 μm); **(C)** Nearly mature sporangium with a top-borne annulus (Bar=100 μm); **(D)** Mature sporangium releasing spores following annulus rupture (Bar=50 μm). Panels **(A), (B), (C)**, and **(D)** were imaged using 5×, 50×, 20×, and 20× objective lenses, respectively.



© 植物学报 Chinese Bulletin of Botany

图 4 植物叶片下表皮气孔分布

(A) 槲蕨，伞状结构为孢子囊群盖，放大图显示保卫细胞形态及其内部叶绿体; **(B)** 玉米，放大图显示保卫细胞形态及表皮油状蜡质层; **(C)** 紫竹梅，放大图显示富含花青素的表皮细胞; **(D)** 大桥虎耳草，放大图显示由多个气孔器聚集形成的气孔簇，其气孔下腔系统呈海绵状。为增强表皮复杂结构的显示，(A)和(D)的放大图经过对比度和亮度调整。**(A)**、**(B)**、**(C)**和**(D)**分别采用 20×、20×、10×、20×物镜成像。主图 Bars=200 μm; **(A)**、**(B)**和**(D)**放大图 Bars=20 μm, **(C)**放大图 Bar=50 μm

Figure 4 Stomatal distribution on the lower epidermis of plant leaves

(A) *Drynaria roosii*, the umbrella-like structures are sporangial caps; the magnified view shows the morphology of guard cells and the chloroplasts within them; **(B)** *Zea mays*, the magnified view shows the morphology of guard cells and the epicuticular waxy layer on the epidermis; **(C)** *Tradescantia pallida*, the magnified view shows anthocyanin-rich epidermal cells; **(D)** *Saxifraga daqiaoensis*, the magnified view shows a stomatal cluster formed by aggregated stomatal apparatuses, with a spongy-looking substomatal cavity system. To clearly reveal the complex epidermal structures, the magnified views in **(A)** and **(D)** have been adjusted for contrast and brightness, respectively. Panels **(A), (B), (C),** and **(D)** were imaged using 20×, 20×, 10×, and 20× objective lenses, respectively. Main images, Bars=200 μm; Magnified images, **(A), (B),** and **(D)** Bars=20 μm, **(C)** Bar=50 μm

2.1.3 表皮结构成像

在 10×和 20×物镜下，微距堆叠成像系统能实现各种类型表皮结构的高质量成像(图 4)。从堆叠图像上可清晰分辨气孔的不同排列方式。测试结果显示，槲蕨(*Drynaria roosii*)气孔排布方式为散生型(图 4A)，玉米(*Zea mays*)和紫竹梅(*Tradescantia pallida*)气孔排布方式为平行型(图 4B, C)，大桥虎耳草(*Saxifraga daqiaoensis*)气孔排布方式为簇生型(图 4D)。在槲蕨叶表皮上，可见保卫细胞内的叶绿体；在紫竹梅叶表皮上，可见表皮细胞富含花青素(图 4C)。此外，微距堆叠成像系统还能清晰呈现叶表皮蜡质层，如玉米叶表皮细胞上的光滑油状蜡质(图 4B)，芭蕉(*Musa basjoo*)叶上的微米级蜡质结晶(图 5)。

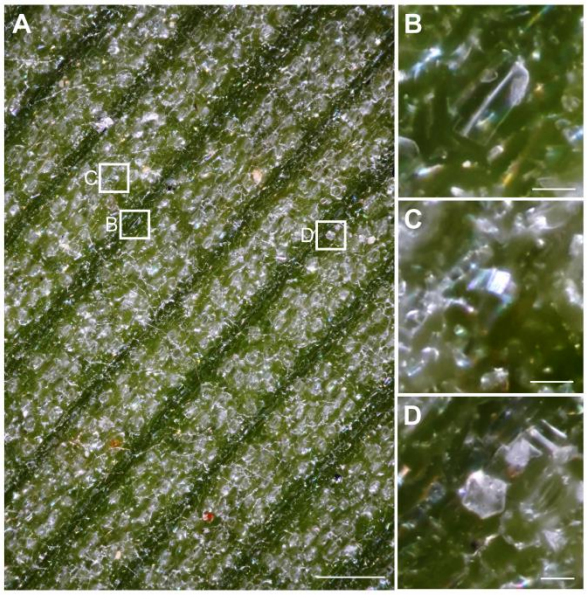


图 5 芭蕉叶背面的蜡质结晶

(A) 显示蜡质结晶堆积于叶表面; **(B)** 薄片状蜡质结晶; **(C)** 环状蜡质结晶; **(D)** 近六边形蜡质结晶。图像均采用 10×物镜成像。**(A)** Bar=200 μm; **(B)–(D)** Bars=20 μm

Figure 5 Epicuticular wax crystals on the abaxial leaf surface of *Musa basjoo*

(A) Overall view of the abaxial surface showing a dense wax layer; **(B)** Thin plate-like crystals; **(C)** Thick plate-like crystals; **(D)** Nearly hexagonal crystals. All panels were imaged using a 10× objective lens. **(A)** Bar=200 μm; **(B)–(D)** Bars=20 μm

在 10×和 20×物镜下，植物不同器官上的毛状体均清晰可见(图 6)。例如，通泉草(*Mazus pumilus*)叶片边缘的毛状体呈单尖锥状(图 6A)，毛泡桐(*Paulownia tomentosa*)叶片上的腺毛顶端呈球状(图 6B)，蒲公英(*Taraxacum mongolicum*)叶片的毛状体呈念珠状(图 6C)，黄花风铃木(*Handroanthus chrysanthus*)叶片的毛状体呈星状和盾状(图 6D)等。此外，在豨莶(*Sigesbeckia orientalis*)总苞片上，还可见腺毛头部中的叶绿体(图 6E)；在琉璃繁缕(*Anagallis arvensis*)花丝上，还可见球状腺毛中富含花青素(图 6F)。

© 植物学报 Chinese Bulletin of Botany

2.1.4 **孢粉形态**

在20×和50×物镜下，微距堆叠成像系统可清晰呈现植物各类型孢粉的大小、形状、颜色以及表面纹饰(图7)。在孢粉大小方面，最小仅30 μm的水稻(*Oryza sativa*)和木贼(*Equisetum hyemale*)的小型孢粉也清晰可见(图7A, L)。在形状方面，水稻、金铃花(*Abutilon pictum*)和朱槿(*Hibiscus rosa-sinensis*)的球形花粉(图7A, E, F)、丝瓜(*Luffa aegyptiaca*)的椭球形花粉(图7C)、水鬼蕉(*Hymenocallis littoralis*)的舟形花粉(图7G)以及半边旗(*Pteris semipinnata*)的三角形孢子(图7K)都清晰可见。在颜色方面，玉米中同时存在的透明与黄色花粉(图7B)以及木贼中同时存在的绿色、浅绿色和橙黄色孢子(图7L)均清晰可见。

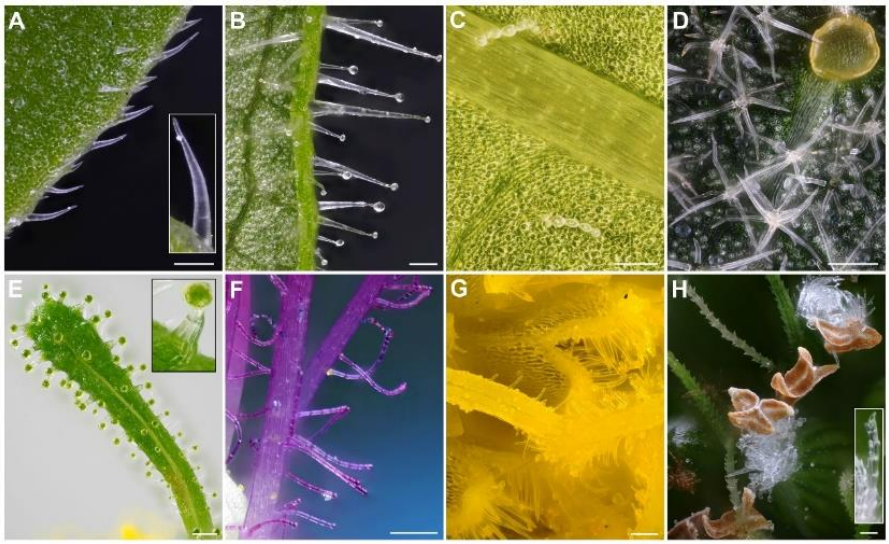


图6 植物器官表面毛状体

(A) 通泉草叶缘单尖锥状毛状体; **(B)** 毛泡桐叶缘球状腺毛; **(C)** 蒲公英叶片念珠状毛状体; **(D)** 黄花风铃木叶片星状和盾状毛状体; **(E)** 豨莶总苞片上的球状腺毛; **(F)** 琉璃繁缕花丝上的球状腺毛; **(G)** 蜘蛛菊花冠和花药密集毛状体; **(H)** 狗尾草的多细胞柱头毛。除**(D)**采用20×物镜外，其余均采用10×物镜成像。Bars=200 μm。毛状体术语参照Simpson(2010)的定义。图像经不同程度的数字放大和裁剪处理后呈现。

Figure 6 Surface trichomes on various plant organs

(A) Uniseriate tapering trichomes of *Mazus pumilus*; **(B)** Pilate glandular trichomes of *Paulownia tomentosa*; **(C)** Moniliform trichomes of *Taraxacum mongolicum*; **(D)** Stellate and peltate trichomes of *Handroanthus chrysanthus*; **(E)** Pilate glandular trichomes on the involucral bracts of *Sigesbeckia orientalis*; **(F)** Pilate glandular trichomes on the filaments of *Anagallis arvensis*; **(G)** Dense trichomes on the adaxial surfaces of the corolla and anthers of *Sphagneticola calendulacea*; **(H)** Multicellular stigmatic hairs of *Setaria viridis*. All panels were imaged using 10× objective lenses, except panel **(D)**, which was imaged using a 20× objective lens. Bars=200 μm. Trichome terminology follows Simpson (2010). Images were digitally magnified and cropped to varying degrees for presentation purposes.



© 植物学报 Chinese Bulletin of Botany

图 7 代表性孢子与花粉形态

(A)–(G) 分别为水稻、玉米、丝瓜、变叶珊瑚花、金铃花、朱槿和水鬼蕉的花粉粒; **(H)** 铁皮石斛花粉块; **(I)–(L)** 分别为海金沙、扇叶铁线蕨、半边旗和木贼的孢子。**(A), (C), (E), (I), (J), (K), (L)** Bars=50 μm; **(B), (D), (F), (G), (H)** Bars=100 μm。图像经不同程度的数字放大和裁剪处理后呈现。

Figure 7 Representative spore and pollen morphology

(A)–(G) Pollen grains of *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Luffa aegyptiaca*, *Jatropha integerrima*, *Abutilon pictum*, *Hibiscus rosa-sinensis*, and *Hymenocallis littoralis*, respectively; **(H)** Pollinia of *Dendrobium officinale;* **(I)–(L)** Spores of *Lygodium japonicum*, *Adiantum flabellulatum*, *Pteris semipinnata*, and *Equisetum hyemale*, respectively. **(A), (C), (E), (I), (J), (K), (L)** Bars=50 μm; **(B), (D), (F), (G), (H)** Bars=100 μm Images were digitally magnified and cropped to varying degrees for presentation purposes.

将显微堆叠图像放大后，孢粉表面纹饰同样清晰可见(图 8)。水稻和玉米的花粉表面具光滑褶皱(图 8A)，丝瓜花粉具精细的网状纹饰(图 8C)，变叶珊瑚花(*Jatropha integerrima*)花粉具交替排列的脊状和沟状结构(图 8D)，金铃花花粉具短刺状凸起(图 8E)，朱槿花粉具密集粗刺(图 8F)，水鬼蕉花粉具凸起网状纹饰(图 8G)。铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)构成花粉块的单个花粉粒轮廓亦清晰可辨(图 8H)。半边旗的三角形孢子上表面具明显的三叉星状凸起，并具密集分布的颗粒状纹饰，边缘呈棕色且相对光滑(图 8J, K)。木贼具有独特的透明弹丝结构(图 8L)。



图 8 孢子和花粉的精细结构

(A)–(G) 分别为水稻、玉米、丝瓜、变叶珊瑚花、金铃花、朱槿和水鬼蕉的花粉粒; **(H)** 铁皮石斛花粉块; **(I)–(L)** 分别为海金沙、半边旗**(J, K)**和木贼的孢子。Bars=20 μm

Figure 8 Fine structural details of spores and pollen

(A)–(G) Pollen grains of *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Luffa aegyptiaca*, *Jatropha integerrima*, *Abutilon pictum*, *Hibiscus rosa-sinensis*, and *Hymenocallis littoralis*, respectively; **(H)** Pollinia of *Dendrobium officinale*; **(I)–(L)** Spores of *Lygodium japonicum, Pteris semipinnata* **(J, K)** and *Equisetum hyemale*, respectively. Bars=20 μm

2.1.5 **植物化石微形态**

微距堆叠成像系统在植物化石堆叠成像中也有较大应用潜力。在 20×物镜下，利用该技术可透过琥珀基质清晰呈现保存在琥珀内的植物器官表面结构。对植物琥珀化石的成像，可清晰呈现琥珀内密集排列的星状毛状体(图 9A, B)。对远古蕨类植物叶片页岩化石成像显示，在叶片边缘有圆形凸起或凹陷区域，疑似为孢子囊结构(图 9C)。通过微距堆叠成像，可见这些区域表面附着大小不一的黑色碳结晶(10–50 μm)，但未见孢子囊或孢子特征结构(图 9D)。这说明在漫长地质过程中，该页岩中原有的叶片结构均已碳化，无法提供有价值的微形态信息。

© 植物学报 Chinese Bulletin of Botany

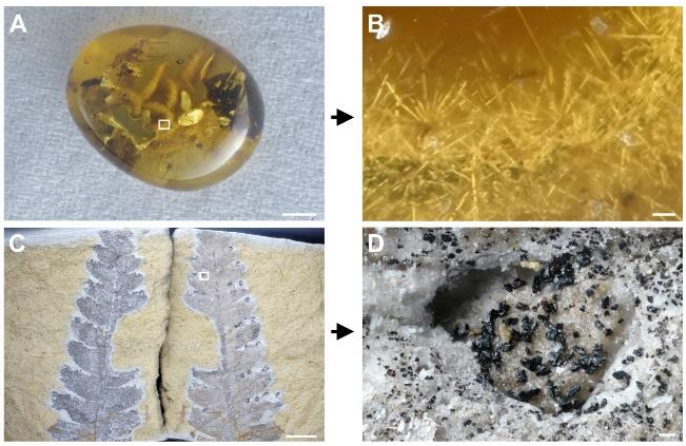


图 9 植物化石微形态

(A) 植物琥珀化石，可能为花器官(Bar=2 mm); **(B)** 器官表面密布星形毛状体(Bar=50 μm); **(C)** 蕨类植物叶片页岩化石(Bar=5 mm); **(D)** 疑似孢子囊区域(Bar=50 μm)。 **(A)**和**(C)**采用尼康 D810 单反相机配老蛙 100 mm 微距镜头拍摄; **(B)**采用 5×物镜成像, **(D)**采用 20×物镜成像。图像经不同程度的数字放大和裁剪处理后呈现。

Figure 9 Microstructures of plant fossils

(A) Plant fossil preserved in amber, possibly representing a floral organ (Bar=2 mm); **(B)** Magnified view showing densely arranged stellate trichomes on the epidermal surface (Bar=50 μm); **(C)** Fern leaf fossil (Bar=5 mm); **(D)** Magnified view of the leaf margin showing paired depressions corresponding to dehiscent sporangia (Bar=50 μm). Panels **(A)** and **(C)** were captured using a Nikon D810 DSLR camera with a Laowa 100 mm macro lens and macro focus stacking. Panel **(B)** was imaged using a 5× objective lens, and panel **(D)** using a 20× objective lens. Images were digitally magnified and cropped to varying degrees for presentation purposes.

2.2 讨论

2.2.1 微距堆叠成像系统的性能测定与机制分析

为客观评价本系统的成像性能，我们采用 1951 USAF 分辨率测试靶对各物镜进行了实测。该方法通过拍摄标准线对靶标，根据人眼或软件可清晰分辨的最小线对组别，换算得到对应的空间分辨率，是光学成像系统中常用的经验性评价方法之一。实测结果表明，5×/0.14 NA 物镜的系统分辨率约为 2.46 μm，与理论值(2.40 μm)基本一致(偏差约 2%)；而 10×–50×物镜的实测分辨率约为 1.74–0.87 μm (表 1)，较理论分辨率存在 40%–55%的差距。该偏差在显微成像系统中较为常见，主要与聚光镜数值孔径匹配、光路对中精度、采样条件及样品特性等因素有关。尽管高倍物镜的实测分辨率未完全达到理论极限，但整体结果表明本系统能够较稳定地接近各物镜的有效分辨能力，且分辨率随数值孔径增加呈提升趋势。当前成像性能主要受限于物镜光学参数及成像条件，而非图像采集或后处理过程引入的额外损失。

在景深扩展机制方面，传统光学显微镜在高数值孔径下受到景深制约。以 NA=0.4 的 20×物镜为例，其理论景深不足 1.5 μm，远无法覆盖植物表面几十至几百微米的起伏范围，这意味着在一张单帧图像中，只有极薄的一层结构是清晰的，而毛状体的顶端与基部、花粉外壁的凸起与凹陷无法同时聚焦。本系统通过沿光轴步进采集 50–300 幅图像，通过步进间距调节确保相邻焦平面的清晰区域有足够重叠。在此基础上，堆叠算法基于局部对比度或频域特征逐像素识别最佳聚焦区域，并融合生成全焦面图像，从而在不改变光学分辨率的前提下有效扩展景深。该机制使该系统能够适用于表面起伏较大、结构复杂的植物微形态观察，如孢子囊开裂结构、多细胞毛状体及花粉外壁网状纹饰等(图 3，图 6，图 8)。

在色彩保留方面，本系统采用彩色 CMOS 传感器(Nikon Z5，全画幅，约 2 430 万有效像素)配合约 6 000 K 白光 LED 照明，实现对样品可见光反射或透射信号的记录。该成像方式基于 RGB 三通道响应，在可见光范围内能够较好地呈现植物表面的综合色彩信息。植物表面颜色主要来源于色素(如叶绿素、花青素和类胡萝卜素)以及部分结构色效应(如薄膜干涉或微结构散射)，对这些综合色彩特征的保留，可辅助区分活组织与衰老或坏死区域、识别不同类型毛状体。

2.2.2 微距堆叠成像的技术定位与比较优势

本研究表明，通过对光学组件的合理配置，微距堆叠成像技术能够有效应用于植物微形态研究，可覆盖从小器官(如种子、孢子囊)、组织(如表皮、毛状体)到细胞水平(如花粉、孢子)

等多尺度(图 2–图 9)。实测结果显示，该系统的分辨率可达 0.9–2.5 μm (表 1)，介于体视显微镜(约 1–5 μm)与扫描电子显微镜(约 0.2–5 nm)之间。虽然其分辨率无法达扫描电子显微镜的纳米级解析能力，但对于植物微形态中大量存在的微米级结构而言，已足以支撑有效的形态学判读。

与体视显微镜相似，本系统操作简便，样品无需处理，即可进行实时观察并保留真实色彩，适用于快速筛查以及低倍(≤50×)大范围观察。然而，体视显微镜在高倍率下的景深极浅，对于表面起伏明显的结构(如毛状体、孢子囊及花药开裂残片)无法实现全焦面清晰成像。相比之下，本系统即使在高倍率下也能获得植物微形态的全焦面清晰图像。需要指出的是，部分高端体视显微镜虽然也配备堆叠成像模块，但其成本远高于本系统的自建方案。此外，在光学性能方面，本系统采用平场复消色差物镜(Plan Apo)，其高数值孔径和完善的像差校正，使成像分辨率和边缘清晰度均优于体视显微镜配备的常规消色差物镜(Murphy and Davidson, 2012)。与体视显微镜相比，本系统的核心优势在于显著延长的景深和更高质量成像。

在超微结构解析方面，扫描电子显微镜相比光学显微系统具有不可替代的优势，能够清晰呈现表皮蜡质晶体(曾霓等, 2025)、花粉外壁精细纹饰(Chang et al., 2021)、孢子壁精细结构(戴锡玲等, 2008)及细胞壁微纤丝排列(Zhang et al., 2014)等纳米级结构。然而，利用扫描电子显微镜观察，样品制备复杂，需经过固定、脱水、临界点干燥及金属镀膜，其中样品固定与脱水过程可能提取或移动表面可溶性物质(如蜡质、黏液、分泌物) (Egerton, 2005)，干燥过程可导致细胞塌陷，尤其对薄壁组织、花瓣及幼嫩叶片影响明显，从而改变原始表面形貌(Pathan et al., 2008)。同时，扫描电子显微镜基于电子信号成像，无法提供真实色彩信息，而色彩在植物微形态研究中常携带重要的生物学信息。在设备成本方面，常规钨灯丝扫描电子显微镜价格为 50–150 万元，场发射扫描电子显微镜价格为 200–500 万元，且需定期维护。

相比之下，本系统成本低(1–5 万元)，可在常规环境下直接成像，能够保留样品天然色彩和表面原始状态。在实际研究中，微距堆叠与扫描电子显微镜应为互补关系。微距堆叠适用于微米级彩色大景深成像与快速筛查，扫描电子显微镜用于纳米级超微结构精细解析；微距堆叠获得的高质量彩色图像可作为参考辅助扫描电子显微镜灰度图像的伪彩增强与结构判读(Kofroňová and Benada, 2017)。

2.2.3 三维重建潜力与跨学科应用

利用微距堆叠成像系统获得的多焦平面图像序列，在理论上还可用于植物微形态结构的高精度三维重建(Leménager et al., 2023; Wolcott et al., 2023)。通过将图像导入摄影测量软件(如 Metashape、Meshroom 或 COLMAP)，可生成具有微米级分辨率的三维模型，并较好地保留样本表面的几何形态和纹理细节。其原理在于：堆叠序列中的每一幅图像对应不同的深度切片，这些切片提供了密集的深度约束信息，可显著提升运动恢复结构和多视图立体匹配算法的重建精度。相比大量基于单视角图像或低精度深度传感器的简化表面重建方法，本技术在分辨率和几何保真度方面具有明显优势。具体应用于以下场景：花粉或孢子的三维形态重建(为孢粉学提供更完整的形态数据)、毛状体的空间分布与朝向分析(有助于理解植物与环境的相互作用)、果实或种子的整体三维建模(可定量分析表面雕纹的体积与深度)等。

除应用于植物学领域外，本系统的技术特点使其在多个生物学领域具有推广潜力。在昆虫形态学研究中，可对体表刚毛、复眼、翅面鳞片等微米级结构进行彩色大景深成像。在真菌学研究中，可用于孢子形态、菌丝结构及产孢器官的观察。在水生生物学研究中，可对甲壳类、藻类等浮游生物进行活体或固定样本成像。此外，本系统成本低、易操作，使其特别适用于生物虚拟标本馆构建、生物学教学以及科普活动等。

2.2.4 未来优化方向

尽管本研究已验证了微距堆叠成像系统应用于植物微形态研究的可行性和优势，但该系统在硬件性能和算法算力等方面仍有较大的提升空间。

(1) 硬件升级

在光学系统方面，采用远心光学结构是一个值得探索的方向。非远心物镜的放大倍率会随工作距离变化而产生漂移，即近大远小效应，可能在成像过程中出现几何失真。远心镜头通过优化光阑位置使主光线近似平行于光轴，从而实现恒定的放大倍率与低畸变(通常可达 0.1% 或更低)，同时具有更对称的离焦特性(Watanabe and Nayar, 1995)。在本系统中引入远心镜

头，有望提高二维成像与三维重建的几何精度，尤其适用于涉及定量测量的应用场景，如毛状体长度、气孔密度及表皮细胞面积。

在照明组件方面，通过引入窄带 LED 光源或滤光片，本系统性能有望获得提升。例如，在蓝紫光波段，植物表皮细胞轮廓及微细纹饰的对比度会得到增强(Lenk et al., 2007)。在近红外及短波红外波段，植物组织区域的反射主要受水分吸收控制，随着含水量的降低，其反射率通常增加，可应用于植物水分状态的无损检测与表型分析(Zahir et al., 2022; Purwadi et al., 2023)。

(2) 算法改进

在堆叠融合算法方面，传统基于对比度或清晰度评价函数的方法在复杂光学条件下存在较大局限。例如，在强反光表面(如蜡质层或光滑种皮)区域，由于局部高亮饱和导致梯度或对比度响应异常，易引起权重误判，从而产生光晕效应；而在透明或半透明结构(如薄表皮或含水组织)中，由于对比度不足及焦平面间过渡连续，常导致分层噪声或边界模糊。针对上述问题，深度学习方法为多焦点融合提供了一种数据驱动的解决思路。

卷积神经网络通过局部感受野对边缘与纹理进行稳定表征，可在一定程度上缓解由局部对比度异常引起的权重失真；而引入自注意力机制的 Transformer 结构能够在不同焦平面之间建立长程依赖关系，从而对跨区域亮度不连续及弱纹理区域进行全局一致性约束。基于二者的混合架构在复杂成像条件下表现出更好的伪影抑制能力，尤其在高反光区域及透明组织边界处，可减少错误融合导致的结构断裂与边界漂移(Wang et al., 2023; Zhai et al., 2025; Luo et al., 2025)。需要指出的是，该方法的性能在较大程度上依赖于训练数据的分布特征，其在不同组织类型及成像条件下的泛化能力仍有待进一步验证。因此在实际应用中仍需结合传统方法进行约束与校正，以实现稳定可靠的融合效果。

3 注意事项

3.1 微距成像系统组件与组装

(1) 全画幅高分辨率相机因其视场大、细节丰富、噪点低，更适合微距堆叠成像。APS-C 或截剪传感器相机视野较小，可能需要额外的图像拼接步骤。传统单反相机亦可使用，但应注意其像素数量和动态范围。

(2) 不同型号相机接口需配备专用无限远管镜组连接器(常见 C 接口→EF 接口或→E 接口两种规格)。

(3) 定期使用擦镜纸或超细纤维布清洁镜头和物镜，配合使用洗耳球去除灰尘，以防成像伪影。

3.2 连续焦点序列拍摄

(1) 连续拍摄过程中需减少环境振动，严禁触碰或移动装置桌面。

(2) 对于高倍成像，需减小光源与样品间的距离以增加成像亮度和对比度。

(3) 避免植物样品在 LED 灯下长时间照射，以免快速失水造成微形态结构被破坏。

3.3 微距堆叠合成

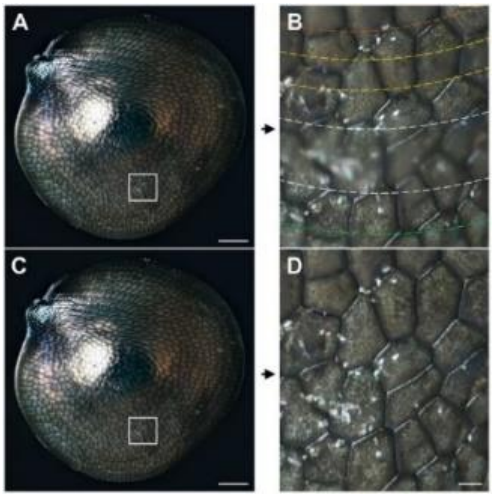


图 10 步长对微距堆叠成像的影响(以青葙种子为例)
(A), (B) 步长 20 μm 拍摄的图像，同色虚线间的间隙表示连续焦平面之间未覆盖的区域；**(C), (D)** 步长 10 μm 拍摄的图像，显示对焦重叠改善，结构细节完整清晰。**(A), (C)** Bars=200 μm; **(B), (D)** Bars= 20 μm
Figure 10 Effect of step interval on macro focus stacking. Example shown using seeds of *Celosia argentea*.
(A), (B) Images captured with a step interval of 20 μm, the gaps between dashed lines of the same color indicate regions not covered between consecutive focal planes; **(C), (D)** Images captured with a 10 μm step interval, showing improved focal overlap and sharper structural details. **(A), (C)** Bars=200 μm; **(B), (D)** Bars= 20 μm

微距堆叠后需仔细检查图像所有区域。

(1) 如果发现堆叠图像中间和/或边缘有部分区域模糊，说明拍摄焦点的起止位置设置不合理，需重新调节起止位置，确保连续焦点覆盖全部拍摄区域。

(2) 如果发现图像中有平行交替的模糊条带, 说明在固定景深条件下, z 轴步长过大, 需适当减小步长值。例如, 图 10 中, 20 μm 步长堆叠成像的青葙(*Celosia argentea*)种子上出现交替模糊条带, 说明步长和景深组合不足以覆盖整个种子, 将步长减小至 10 μm 后, 获得的种子图像完整清晰、细节分明。

(3) 如果发现图像存在畸变、光晕或拼接伪影, 可调整软件渲染方法或参数, 或调节 LED 光照或柔光设备后重新采集图像。

3.4 比例尺校准

若用不同物镜或相机设置, 需为每种配置专门拍摄比例尺图像, 确保校准准确。

致谢 衷心感谢广东韶关丹霞山国家级自然保护区管理局陈昉主任对研究方案与材料选择提供的指导; 感谢微距摄影爱好者陈红威先生(哔哩哔哩 UID: 392094847)对微距堆叠成像系统的搭建和应用提供技术支持。

作者贡献声明

常圣鑫: 设备组装、方法测试及论文撰写; 罗佳怡, 黄凯淇: 样品采集、处理及微距堆叠成像; 何根云, 张朝玉, 罗有辉, 韩伟: 图片处理和论文修订; 林哲丽: 样品采集; 李春霞, 于白音: 实验设计及论文审阅。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests: The authors declare that there is no conflict of interests.

©The author(s) 2026. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

参考文献

Akbarzadeh K, Wallman JF, Sulakova H, Szpila K (2015). Species identification of Middle Eastern blowflies (*Diptera*: *Calliphoridae*) of forensic importance. *Parasitol Res* **114**, 1463–1472.

Braker EM (2022). Phototank setup and focus stack imaging method for reptile and amphibian specimens (*Amphibia*, *Reptilia*). *ZooKeys* **1134**, 185.

Chang S, Li C, Jiang Y, Long Y, Li Y, Yin J (2021) Characteristics of the pollen morphology and viability of *Bougainvillea* (Nyctaginaceae). *Sci Hortic* **277**, 109732.

Dai XL, Cao JG, Wang QX (2008). Formation and development of sporoderm of *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn. (Parkeriaceae). *Chin Bull Bot* **25**, 72–79. (in Chinese with English abstract)

戴锡玲, 曹建国, 王全喜 (2008). 水蕨孢子壁的形成和发育. 植物学通报 **25**, 72–79.

Egerton RF (2005). Physical Principles of Electron Microscopy, Vol.56. New York: Springer.

Floriano CFB, Rodrigues HD (2016). A new species of *Oiovelia* (*Heteroptera*: *Gerromorpha*: *Veliidae*) from Mesoamerica, with an identification key to the genus. *Zootaxa* **4144**, 584–592.

Johnson D (2008). How To Do Everything: Digital Camera. McGraw-Hill, Inc.

Kofroňová O, Benada O (2017). RGB color coded images in scanning electron microscopy of biological surfaces. *Acta Virolog* **61**, 349–352.

Leménager M, Burkiewicz J, Schoen DJ, Joly S (2023). Studying flowers in 3D using photogrammetry. *New Phytol* **237**, 1922–1933.

Lenk S, Chaerle L, Pfündel EE, Langsdorf G, Hagenbeek D, Lichtenthaler HK, Van Der Straeten D, Buschmann C (2007). Multispectral fluorescence and reflectance imaging at the leaf level and its possible applications. *J Exper Bot* **58**, 807–814.

Luo F, Zhao B, Fuentes J, Zhang X, Ding W, Gu C, Pino LR (2025). A review on multi-focus image fusion using deep learning. *Neurocomputing* **618**, 129125.

Mertens JE, Van Roie M, Merckx J, Dekoninck W (2017). The use of low cost compact cameras with focus stacking functionality in entomological digitization projects. *ZooKeys* **712**,141.

Murphy DB, Davidson MW (2012). Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging. John Wiley & Sons.

Pathan A, Bond J, Gaskin R (2008). Sample preparation for scanning electron

microscopy of plant surfaces—horses for courses. *Micron* **39**, 1049–1061.
Purwadi I, Erskine P, Ent AVD (2023) Reflectance spectroscopy as a promising tool for 'sensing' metals in hyperaccumulator plants. *Planta* **258**, 41.
Saunders TC, Larridon I, Baker WJ, Barrett RL, Forest F, Françoso E, Maurin O, Rokni S, Roalson EH (2024). Tangled webs and spider-flowers: phylogenomics, biogeography, and seed morphology inform the evolutionary history of *Cleomaceae*. *Am J Bot* **111**, e16399.
Simpson MG (2010). Plant morphology. In: Simpson MG, ed. Plant Systematics (2th edn). San Diego: Academic Press. pp. 451–513.
Wang X, Hua Z, Li J (2023). Multi-focus image fusion framework based on transformer and feedback mechanism. *Ain Shams Engine J* **14**, 101978.
Watanabe M, Nayar SK (1995). Telecentric optics for constant magnification imaging. *IEEE Trans. Pattern Anal Mach Intell* **19**, 1360–1365.
Wolcott KA, Stanley EL, Gutierrez OA, Wuchty S, Whitlock BA (2023). 3D pollination biology using micro-computed tomography and geometric morphometrics in *Theobroma cacao*. *Appl Plant Sci* **11**, e11549.
Zahir SADM, Omar AF, Jamlos MF, Azmi MAM, Muncan J (2022). A review of visible and near-infrared (Vis-NIR) spectroscopy application in plant stress detection. *Sensor Actuat A Phys* **338**, 113468.
Zhai H, Chen L, Lin B, Deng M, Yang Y (2025). Hybrid-domain parallel attention and collaborative interaction transformer for multi-focus image fusion. *Appl Soft Comput* **183**, 113683.
Zhang T, Mahgsoudy-Louyeh S, Tittmann B, Cosgrove DJ (2014). Visualization of the nanoscale pattern of recently-deposited cellulose microfibrils and matrix materials in never-dried primary walls of the onion epidermis. *Cellulose* **21**, 853–862.
Zeng N, Sun WY, Shu JP, Zhou DG, Yan YH, He ZX (2025). Study on Leaf Epidermal Micromorphology and Superhydrophobic Effect in Ferns. *Chin Bull Bot* doi: 10.11983/CBB25141. (in Chinese with English abstract)
曾霓，孙维悦，舒江平，周定港，严岳鸿，何祖霞 (2025). 蕨类植物叶表皮微形态与超疏水效应研究. 植物学报 doi: 10.11983/CBB25141.

A Low-Cost Macro Focus Stacking Approach for High-Depth-of-Field Imaging of Plant Micromorphology

Shengxin Chang[1], Jiayi Luo[1], Genyun He[2], Kaiqi Huang[1], Youhui Luo[1], Wei Han[1], Zheli Lin[1], Chaoyu Zhang[2], Chunxia Li[1*], Baiyin Yu[1*]

[1]College of Biology and Agriculture, Guangdong Provincial Key Laboratory of Utilization and Conservation of Food and Medicinal Resources in Northern Region, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China; [2]Rural Revitalization Service Center of Nanxiong City, Shaoguan 512499, China

Introduction: Plant micromorphology provides essential morphological evidence for species identification, functional trait analysis, and evolutionary studies. However, acquiring high-quality micromorphological images has traditionally required expensive optical microscopes and complex sample preparation, which limits accessibility for small- to medium-sized laboratories and educational settings. Recently, macro focus stacking—a photographic technique widely used to capture high-depth-of-field images—has emerged as a low-cost alternative for high-resolution imaging. Despite its potential, systematic workflows optimized for plant specimens remain scarce.

Rationale: To address these limitations, we developed a cost-effective and efficient imaging workflow tailored for plant micromorphology. The system integrates commercially available components, including long working distance microscope objectives, a full-frame digital camera, a motorized focusing rail, and professional image-stacking software. The workflow is designed to: overcome the shallow depth-of-field inherent in high-magnification imaging by sequentially capturing and fusing focal planes; Preserve the natural color and morphology of plant tissues; Avoid complex sample preparation, thereby minimizing preparation-induced artifacts such as surface shrinkage or structural collapse. The

workflow encompasses sample collection and minimal preparation, system assembly, sequential focal-plane acquisition, image stacking and fusion, and scale calibration. The total hardware cost ranges approximately from 10 000 to 50 000 CNY, making the system accessible to small- and medium-sized laboratories without compromising imaging quality.

Results: Evaluation using USAF 1951 resolution targets demonstrated that the system achieves a practical resolution of 0.87–2.46 μm, depending on the optical configuration, imaging conditions, and the numerical aperture of the objective lens. This resolution allows stable visualization of micron-scale structures, including epidermal cell contours, trichome morphology, primary ornamentation of pollen exines, and seed surface sculptures. Compared with conventional optical microscopy, focus-stacking substantially extends the depth of field, enabling full-focus imaging of structurally complex, three-dimensional surfaces that cannot be captured in a single frame. The system operates under ambient conditions, preserves true-to-life color, and avoids common preparation artifacts. Its low hardware cost, operational flexibility, and ease of assembly make it particularly suitable for small- and medium-sized plant biology laboratories.

Conclusion: We present a practical, low-cost macro focus stacking workflow for plant micromorphological imaging that delivers micron-scale resolution, extended depth of field, and artifact-free, color-accurate images. The method is well-suited for taxonomic and morphological studies, botanical education, virtual herbarium construction, and science outreach. By combining affordable hardware with a streamlined workflow, this system provides an efficient and accessible solution for high-quality imaging of plant organs and cellular structures, bridging the gap between conventional light microscopy and high-resolution morphological analysis without the need for complex sample preparation.



A focus-stacked macro image showing a crustose lichen with dense white granular propagules and brown nodular thallus structures.

Key words plant micromorphology, macro focus stacking, low-cost imaging

Chang SX, Luo JY, He GY, Huang KQ, Luo YH, Han W, Lin ZL, Zhang CY, Li CX, Yu BY (2026). A low-cost macro focus stacking approach for high-depth-of-field imaging of plant micromorphology. *Chin Bull Bot* **61**, 1–14.

* Authors for correspondence. E-mail: LeeOlivia2015@outlook.com; 540391135@qq.com

（责任编辑：白羽红）