

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.01.002

李晓娟, 李建秀, 孙经兴, 等. 扫描电镜下山东丹参与近缘种花粉形态特征比较观察[J]. 广西植物, 2013, 33(1): 20–24

Li XJ, Li JX, Sun JX, et al. Observation and comparison on morphological characteristics of pollen of *Salvia shandongensis* and its relatives by SEM[J]. Guihaia, 2013, 33(1): 20–24

扫描电镜下山东丹参与近缘种 花粉形态特征比较观察

李晓娟¹, 李建秀^{1,2}, 孙经兴², 宋英杰², 张永清^{1*}

(1. 山东中医药大学 药学院, 济南 250355; 2. 山东力明科技职业学院, 济南 250116)

摘要: 采用光学显微镜和扫描电镜相结合, 对山东丹参、丹参、南丹参发育良好成熟的花粉粒进行比较观察。结果表明: 花粉粒形态、大小和外壁网状雕纹特征均具有较显著区别, 首次为山东丹参新种积累孢粉学资料, 确立其在植物分类学上的地位以及研究其种质, 提供花粉形态的重要依据; 丹参和南丹参花粉粒形态特征及外壁网状雕纹与前人报道相一致, 为揭示山东丹参与丹参、南丹参之间的亲缘关系及种间分类鉴定提供了孢粉学依据; 也为山东丹参药用植物新资源的开发提供科学依据。

关键词: 山东丹参; 丹参; 南丹参; 花粉形态; 扫描电镜

中图分类号: Q944.571 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2013)01-0020-05

Observation and comparison on morphological characteristics of pollen of *Salvia shandongensis* and its relatives by SEM

LI Xiao-Juan¹, LI Jian-Xiu^{1,2}, SUN Jing-Xing²,

SONG Ying-Jie², ZHANG Yong-Qing^{1*}

(1. College of Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;

2. Shandong Liming Polytechnic Vocational College, Jinan 250116, China)

Abstract: Well-developed mature pollen grains of *Salvia shandongensis*, *S. miltiorrhiza* and *S. bowleyana* are examined by using light microscope and scanning electron microscope. The results indicated that there were clear distinctions among the shape, size and exine sculpture of *S. miltiorrhiza* plants' pollen. This study not only first provided the important pollen morphological basis for accumulating the palynology information for *S. shandongensis* new species, establishing its position in plant taxonomy and researching its species quality; pollen grains morphological features and exine sculpture of *S. miltiorrhiza* and *S. bowleyana* were consistent with previous reports and provided the palynology information for revealing their genetic relationships of *S. shandongensis*, *S. miltiorrhiza* and *S. bowleyana* and distinguishing their species taxonomy, but also provided scientific basis for the development of new medicinal plant resources of *S. shandongensis*.

Key words: *Salvia shandongensis*; *S. miltiorrhiza*; *S. bowleyana*; pollen morphology; scanning electron microscope

* 收稿日期: 2012-05-25 修回日期: 2012-08-07

基金项目: 山东省科技发展计划项目(2008GG2NS02022); 山东省农业良种工程项目(2009LZ01-03)

作者简介: 李晓娟(1986-), 女, 山东临沂市人, 硕士研究生, 从事中药资源学、质量控制的研究, (E-mail) Lixiaojuan124@163.com。

* 通讯作者: 张永清, 教授, 博士生导师, 从事药用植物栽培与中药资源的教学、科研工作, (E-mail) zyxq622003@126.com。

山东丹参(*Salvia shandongensis*)是1993年发表的一个新分类群(李建秀等,1993),在产地多年与丹参一起入药。前人对山东丹参、丹参和南丹参研究较多,如植物分类学(吴征镒等,1977;肖培根等,2002)、药材性状(周凤琴等,1995;肖培根,2002)、化学成分(肖培根,2002)、花粉孢粉学(徐任生,1990;蔡继炯等,1987;杨德奎等,2003)、小坚果果实种类学(孙群等,2004;王彩红等,2007)、叶表皮形态(张利,2008)等,但对山东丹参发育良好的成熟花粉、小坚果、叶表皮及其附属物、DNA遗传物质、有效成分研究尚未见有文献报道。为开发山东丹参中药新资源,本文采用光学显微镜和扫描电镜相结合,对山东丹参及其近缘种丹参和南丹参花粉形态进行系统研究,取得了创新性的成果:山东丹参花粉形态及外壁网状雕纹与丹参和南丹参有明显区别,作首次报道;丹参和南丹参花粉形态及外壁网状雕纹与前人(杨德奎等,2003;徐任生,1990;蔡继炯等,1987;Henderson *et al.*,1968)的研究报道一致。不仅为山东丹参新种建立及其种质资源提供花粉形态依据,同时也为揭示山东丹参、丹参和南丹参亲缘关系和种间分类鉴别提供孢粉学资料,并为山东丹参药用植物新资源的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

(1)山东丹参(*S. shandongensis*)采自野生植株成熟花粉粒,凭证标本为李建秀 2011034。(2)丹参(*S. miltiorrhiza*)采自山东中医药大学药用植物园成熟花粉粒,凭证标本为李晓娟 2011029。(3)南丹参(*S. bowleyana*)舒四燕引自江西龙虎山,栽培山东力明科技职业学院,采自成熟花粉粒,凭证标本为李晓娟 2011032。凭证标本经山东中医药大学药学院李建秀教授鉴定,藏于山东中医药大学药用植物标本室(SDCM)。

1.2 方法

选取山东丹参、丹参、南丹参凭证标本发育良好成熟的花粉粒,做临时水装片,透化,观察及测量20粒花粉极轴和赤道轴(王伏雄等,1997),按照统计学处理。在此基础上,另从3种凭证标本上取成熟花粉粒,分别均匀地散在标本托双面胶纸上,喷金后置于德国蔡司 SUPRATM55 热场发射扫描电镜下,并观察花粉的极面和赤道面,各10粒,挑选典型、有

代表性的花粉粒,放大倍数由高倍($\times 5\,000$)到低倍($\times 1\,500$),待电压稳定,调整焦距,照相,使用 Adobe Photoshop 软件处理照片做图版。

2 观察结果

2.1 山东丹参花粉形态

山东丹参发育良好成熟的花粉粒,赤道面观为类圆形或椭圆形,大小为 $33.3(30.7\sim 36.2)\,\mu\text{m}\times 30.0(24.9\sim 32.3)\,\mu\text{m}$,具6沟,沟至近两极,沟宽且深,沟膜密被颗粒状突起。外壁表面具网状雕纹,网眼小,多角形,具大小不一的复穿孔或单穿孔,网脊宽不平滑,具不规则疣块状突起,为首次报道。图版 I:1-2。花粉粒极面观为椭圆形,大小为 $10.8\,\mu\text{m}\times 6.6\,\mu\text{m}$,其边缘具6沟。外壁表面具网状雕纹,网眼小,类圆形,具大小不一单穿孔或复穿孔,网脊不平滑(图版 II:1-2)。

2.2 丹参花粉形态

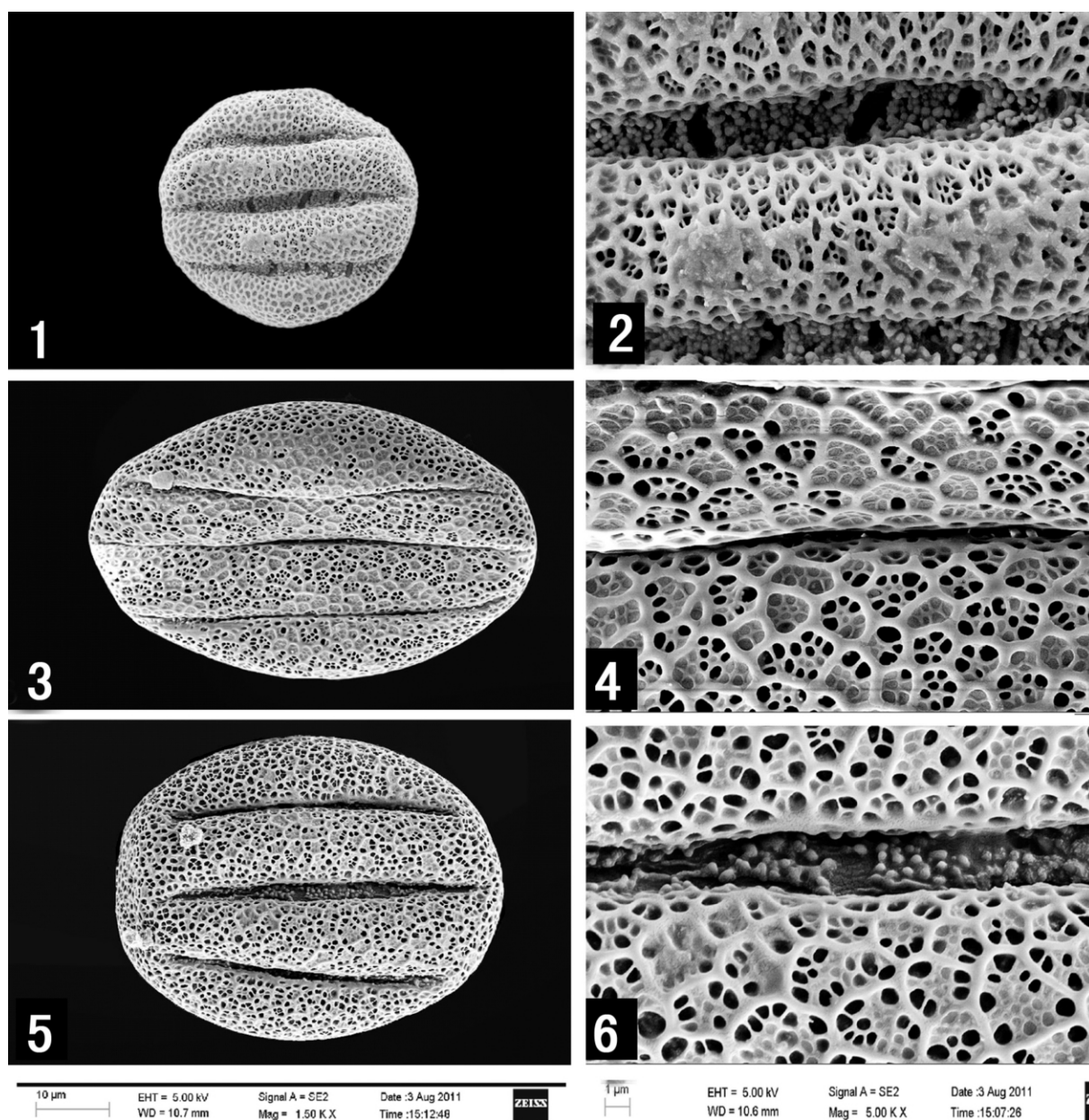
丹参花粉粒赤道面观为长椭圆形,大小为 $54.4(52.2\sim 55.5)\,\mu\text{m}\times 33.6(31.5\sim 38.2)\,\mu\text{m}$,具6沟,沟至近两极,沟窄且深,沟膜被颗粒状突起。外壁表面具网状雕纹,网眼较大,类圆形,多具大小不一的复穿孔,网脊较平滑,与前人(杨德奎等,2003;徐任生,1990;蔡继炯等,1987;Henderson *et al.*,1968)报道一致(图版 I:3-4)。花粉粒极面观为扁球形,大小为 $12.5\,\mu\text{m}\times 8.3\,\mu\text{m}$,其边缘具6沟。外壁表面具网状雕纹,网眼较小,类圆形,多具大小不一的单穿孔或复穿孔,网脊平滑,与蔡继炯等(1987)报道一致(图版 II:3-4),而杨德奎等(2003)报道花粉粒极面观为长串珠形。

2.3 南丹参花粉形态

南丹参花粉粒赤道面观为椭圆形,大小为 $50.3(49.5\sim 54.0)\,\mu\text{m}\times 41.8(40.2\sim 45.6)\,\mu\text{m}$,具6沟,沟至近两极,沟宽且深,沟膜密被颗粒状突起。外壁表面具有网状雕纹,网眼大,类多边形,大多具有大小不一的复穿孔,网脊平滑,为首次报道(图版 I:5-6)。花粉粒极面观为扁球形、类球形,大小为 $(11.5\times 6.1)\,\mu\text{m}\sim (11.7\times 6.3)\,\mu\text{m}$,其边缘具6沟。外壁表面具网状雕纹,网眼大,呈多边形,复穿孔或单穿孔,网脊平滑,其类球形与徐任生(1990)报道一致(图版 II:5-8)。

2.4 山东丹参与丹参、南丹参花粉形态特征的比较

山东丹参是一新种,与丹参、南丹参为同属植



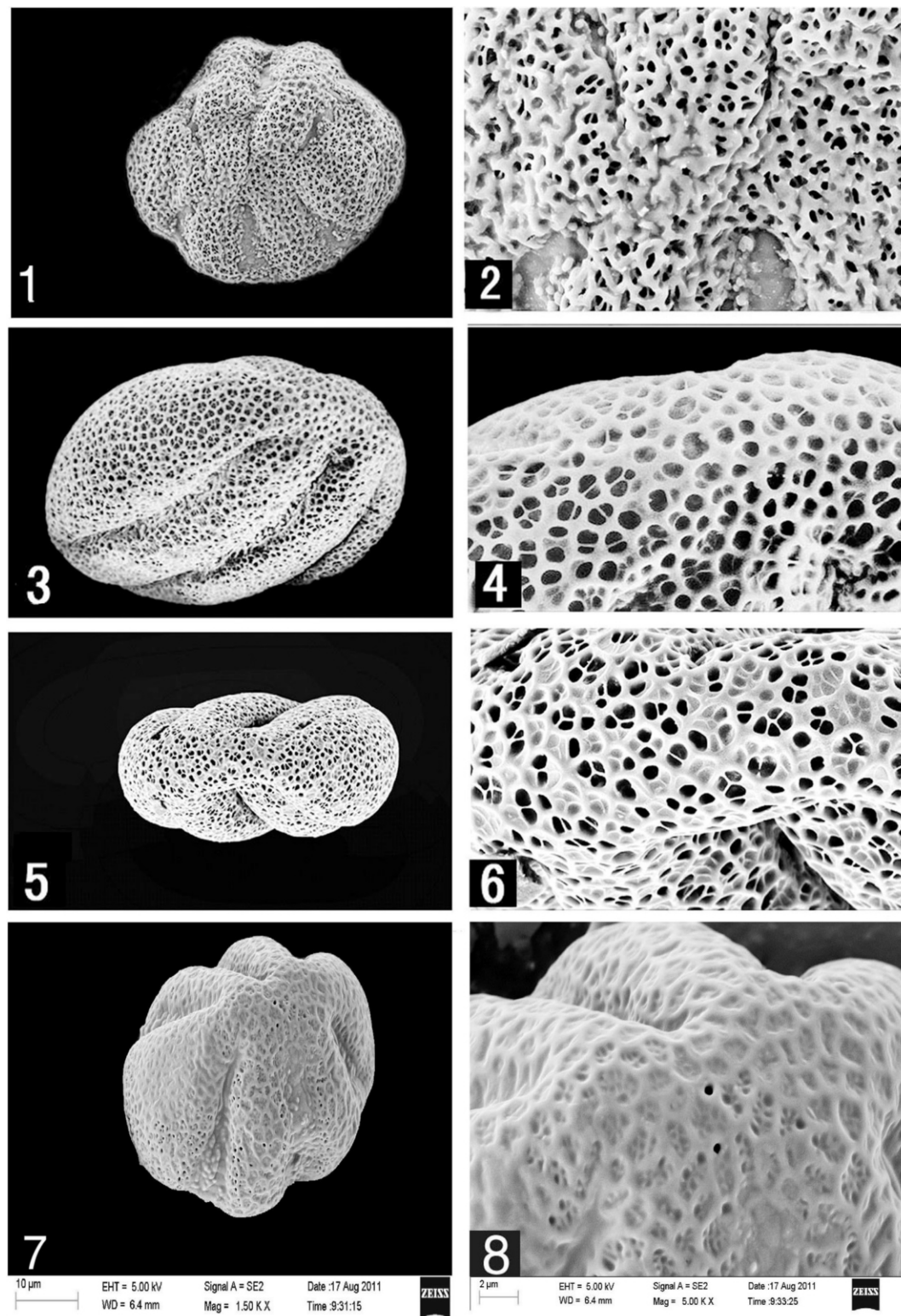
图版 I 扫描电镜下山东丹参、丹参、南丹参花粉粒赤道面观 1-2. 山东丹参; 3-4. 丹参; 5-6. 南丹参。

Plate I Equatorial view of the pollen grains of *Salvia shandongensis*, *S. miltiorrhiza* and *S. bowleyana* by scanning electron microscope 1-2. *S. shandongensis*; 3-4. *S. miltiorrhiza*; 5-6. *S. bowleyana*; 1,3,5. $\times 1500$; 2,4,6. $\times 5000$.

物,在植物分类学上属于近缘种。山东丹参与丹参、南丹参三种花粉粒均为六沟型,外壁为网状雕纹,这些共同特征为它们的近缘关系提供了孢粉学依据。三者的花粉形态特征又有明显区别:山东丹参花粉粒赤道面观为类圆形,极面观为椭圆形,花粉粒小($33.3\ \mu\text{m} \times 30.0\ \mu\text{m}$),网状雕纹网眼小,呈多角形,网脊不平滑(图版 I:1-2;图版 II:1-2),而丹参花粉粒赤道面观为长椭圆形,极面观为扁球形或长串珠

形,花粉粒大($54.4\ \mu\text{m} \times 33.6\ \mu\text{m}$),网状雕纹网眼较大,类圆形,复穿孔,网脊平滑(图版 I:3-4;图版 II:3-4),两者有明显区别;南丹参花粉粒赤道面观为椭圆形,花粉粒较大($50.3 \times 41.8\ \mu\text{m}$),极面观为扁球形,网状雕纹网眼大,类多边形,复穿孔,网脊平滑(图版 I:5-6;图版 II:5-6),也与山东丹参有明显区别。

三种丹参花粉形态相同特征为其近缘种提供孢粉学依据,而花粉粒形态特征的明显区别又为它们



图版 II 扫描电镜下山东丹参、丹参、南丹参花粉粒极面观 1-2. 山东丹参; 3-4. 丹参; 5-8. 南丹参。

Plate II Polar view of the pollen grains of *Salvia shandongensis*, *S. miltiorrhiza* and *S. bowleyana* by scanning electron microscope 1-2. *S. shandongensis*; 3-4. *S. miltiorrhiza*; 5-8. *S. bowleyana*; 1, 3, 5, 7. $\times 1\ 500$; 2, 4, 6, 8. $\times 5\ 000$.

表 1 山东丹参、丹参、南丹参花粉粒主要形态特征

Table 1 Morphological characteristics of the pollen grains of *S. shandongensis*, *S. miltiorrhiza* and *S. bowleyana*

种类 Species	形态 Shape	直径 (μm) Diameter	赤道面观 Equatorial view	极面观 Polar view	图版 Plate
山东丹参 <i>S. shandongensis</i>	类圆形	33.3×30.0	类圆形,网状雕纹,网眼小,多角形,复穿孔或单穿孔,网脊宽不平滑	椭圆形,网状雕纹,网眼小,类圆形,单穿孔或复穿孔,网脊不平滑	图版 I : 1-2; Plate I : 1-2; 图版 II : 1-2; Plate II : 1-2
丹参 <i>S. miltiorrhiza</i>	长椭圆形	54.4×33.6	长椭圆形,网状雕纹,网眼较大,类圆形,复穿孔,网脊较平滑	扁球形,网状雕纹,网眼较小,类圆形,单穿孔或复穿孔,网脊平滑	图版 I : 3-4; Plate I : 3-4; 图版 II : 3-4; Plate II : 3-4
南丹参 <i>S. bowleyana</i>	椭圆形	50.3×41.8	椭圆形,网状雕纹,网眼大,类多边形,复穿孔,网脊平滑	扁球形或类球形,网状雕纹,网眼大,多边形,复穿孔或单穿孔,网脊平滑	图版 I : 5-6; Plate I : 5-6; 图版 II : 5-6; Plate II : 5-6; 图版 II : 7-8; Plate II : 7-8

种间分类鉴定提供了孢粉学依据(埃尔特曼,1969;王伏雄等,1997),见表 1。

3 结论与讨论

3.1 山东丹参与近缘种花粉形态的共同特征

花粉粒是种子植物雄蕊花粉囊内的粉状体,属雄配子体(托马斯 L. 罗斯特等,1981;P. D 摩尔等,1987),是有性生殖器官(严楚江,1964),遗传信息物质的携带者,在植物系统发育中比其他性状更稳定、更保守。花粉粒的形状、大小、颜色、外壁的构造与纹饰及萌发孔(沟)等形态特征,可用以鉴别植物的种类。花粉形态的研究在植物分类学上很重要(冯德培,1983)。山东丹参是一个新分类群,*Salvia* 属的新成员,与丹参花粉粒赤道面观为椭圆形或类圆形,六沟型,花粉粒外壁网状雕纹等共同特征,反映了它们之间有较近的亲缘关系,花粉形态特征为丹参是山东丹参的近缘种提供了孢粉学依据。

3.2 山东丹参与近缘种花粉形态的主要区别特征

山东丹参发育良好成熟的花粉粒,赤道面观为类圆形,其外壁为网状雕纹,网眼小且多边形,常为复穿孔,网脊粗糙不光滑,有较明显的颗粒状突起(图版 I : 1-2)。与丹参花粉粒椭圆形,外壁网状雕纹,网眼较大,具复合穿孔,网脊光滑(图版 I : 3-4;图版 I : 5-6),易于区别。花粉形态特征在同属植物种间的差异,可作为植物进行区分的依据(陈韦等,2010);对花粉粒的描述在新种鉴定中,早已具有或多或少强制的成分(埃尔特曼,1969);花粉形态的研究有助于解决某些植物在分类系统上的地位问题,新属或新种的发现有时也可以花粉的特征来证实(王伏雄等,1997)。因此,山东丹参花粉形态外壁网状雕纹,为其新分类群的建立及研究其种质,与近缘

种丹参种间分类鉴定提供了花粉形态重要资料。

3.3 丹参和南丹参花粉形态均有“二形性”

丹参花粉粒赤道面观为长椭圆形(图版 I : 3-4)或扁球形(蔡继炯等,1987)两种类型;南丹参花粉粒极面观为扁球形(图版 II : 5-6)或类球形(图版 II : 7-8)两种类型,丹参和南丹参花粉粒均有二形性。在同一种植物中,花粉粒具有两种不同的形状,但其外壁网状雕纹是一致的,反映了花粉的二形性(埃尔特曼,1969),这是遗传上固有特征的表现。

综上所述,山东丹参成熟发育良好的花粉粒及其外壁网状雕纹特征,为山东丹参新种的建立首次提供了花粉形态的重要依据,与其近缘种丹参在花粉形态特征上显著区别,故花粉形态特征在山东丹参植物分类学上具有重要的意义。

参考文献:

- 王伏雄,钱南芬,张玉龙,等. 1997. 中国植物花粉形态[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社:2,236
冯德培. 1983. 简明生物学词典[M]. 上海:上海辞书出版社:611—612
托马斯 L. 罗斯特,等. 周经纶,等(译). 1981. 植物生物学[M]. 北京:高等教育出版社:379
严楚江. 1964. 花果形态学[M]. 福州:福建人民出版社:3
吴征镒. 1977. 中国植物志(66 卷)[M]. 北京:科学出版社:145—150
肖培根. 2002. 新编中药志(第 1 卷)[M]. 北京:化学工业出版社:212—229
埃尔特曼. 1969. 中国科学院植物研究所古生物研究室孢粉组(译). 1978. 孢粉学手册[M]. 北京:科学出版社:69,87
徐任生. 1990. 丹参—生物学及其应用[M]. 北京:科学出版社:60—62
蔡继炯,俞中仁. 1987. 蜜源植物花粉形态与成分[M]. 杭州:浙江科学技术出版社:108—109
李建秀,李明,周凤琴,等. 1993. 山东鼠尾草属植物的研究[C]//王伏雄. 北方植物学研究. 天津:南开大学出版社:242—243
周凤琴,彭学莲,李建秀. 1995. 山东产丹参原植物调查和生药(下转第 88 页 Continue on page 88)

强抗寒砧木贝达及抗寒能力差的营养系赤霞珠品种,从它们的基因组中分别克隆出 CBF_2 转录因子,都包含由 58 个氨基酸组成的保守的 AP2 DNA 结合域,以及 PKKPAGRKFRFTRHP 和 DSAWR 特异氨基酸序列,与在其他植物中发现的特征序列一致(Liu *et al.*, 2000),由此说明克隆的 CBF_2 基因具有转录激活活性。通过三种葡萄的 CBF_2 基因同源性及其氨基酸序列理化性质和亲/疏水性的分析,与 GenBank 上登录的原始序列(DQ517297)同源性最低的是赤霞珠,而且其 CBF_2 基因 N-端的 7 个氨基酸序列与山葡萄(北冰红)和贝达的不同,具有较强的疏水性。而在实际的农业生产中贝达和山葡萄(北冰红)能耐 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的低温,而赤霞珠则不能(许宏等, 2003)。那么, CBF_2 转录因子序列同源性较低和 N-端氨基酸及其亲/疏水性的差异是否可能与葡萄品种间抗寒特性的不同有关?尚待于更多的试验资料来证明。

参考文献:

- Gilmour SJ, Stockinger EJ, Zarka DG, *et al.* 1998. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activation as an early step cold-induced COR gene expression [J]. *Plant J*, **16**(4): 436
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, *et al.* 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and low temperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, **10**(8): 1 391—1 406
- Liu Q, Zhang GY, Chen SY. 2000. Isolation and structural analysis of DRE-Binding transcription factor from Maize [J]. *Chin Sci Bull*, **45**(14): 1 465—1 474
- Li XL(李新玲), Xu XL(徐香玲), Wang QW(王全伟). 2010. Study on desiccation tolerance of CBF_2 gene in *Arabidopsis thaliana* (拟南芥 CBF_2 基因的抗旱性研究) [J]. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), **10**(1): 97—103
- Novillo F, Alonso JM, Ecker JR, *et al.* 2004. $CBF_2/DREB1C$ is a negative regulator of $CBF_1/DREB1B$ and $CBF_3/DREB1A$ expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**(11): 3 985
- Niu JF(牛锦凤), Wang ZP(王振平). 2005. Comparison of the cold hardiness of five wine grape Varieties (宁夏地区酿酒葡萄品种抗寒性的比较) [J]. *Sino-overseas Grapevine & Wine* (中外葡萄与葡萄酒), **3**: 17—19
- Schaffer AA, Aravind L, Madden TL. 2001. Improving the Accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements [J]. *Nucleic Acids Res*, **29**: 2 994—3 005
- Vogel JT, Van Buskirk HA, Zarka DG, *et al.* 2005. Roles of the CBF_2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, **41**: 200
- Xu H(许宏), Wang XD(王孝娣), Zou YN(邹英宁)等. 2003. Study on the cold resistance of grape rootstocks and wine grape cultivars (葡萄砧木及酿酒品种抗寒性比较) [J]. *Sino-Overseas Grapevine & Wine* (中外葡萄与葡萄酒), **6**: 51—53
- Zhang X, Fowler SG, Cheng H, *et al.* 2004. Freezing sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing tolerant *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, **39**(6): 905—919
- 鉴定[C]//李法曾等. 山东植物研究. 北京: 科学技术出版社: 358—364
- Chen W(陈韦), Shang HW(商晗武), Gao YS(高永生), *et al.* 2010. The flower and pollen morphology of *Solidago* (一枝黄花属植物的花及花粉形态) [J]. *Guihaia* (广西植物), **30**(1): 55—59
- Henderson *et al.* 1968. Pollen Morphology of *Salvia* and Some Related Genera [J]. *Gran Palynol*, **8**(1): 70—85
- P. D 摩尔, J. A 韦布. 1987. 花粉分析指南 [M]. 李文漪, 等 (译). 广西: 广西人民出版社: 1
- Sun Q(孙群), Liang ZS(梁宗锁), Li SJ(李绍军), *et al.* 2004. Study on configuration fabric and germinative conditions of *Salvia miltiorrhiza* seeds (丹参种子形态结构与吸水萌发特性) [J]. *Chin J Chin Mat Med* (中国中药杂志), **29**(10): 934—937
- Wang CH(王彩红), Wen XH(文雪花), Li LH(李连怀), *et al.* 2007. Identification of *Salvia miltiorrhizae* Bge., *S. przewalskii* Maxim. and *S. umbratica* hance seeds by SEM (丹参、甘西鼠尾、荫生鼠尾种子的扫描电镜鉴别) [J]. *J Hebei Med Univ* (河北医科大学学报), **28**(3): 186—187
- Yang DK(杨德奎), Sun JT(孙京田), Wang BQ(王丙全). 2003. Pollen morphology and taxonomic significance of *Salvia* from Shandong (山东鼠尾草属花粉形态的研究及其在分类上的意义) [J]. *Shandong Sci* (山东科学), **16**(1): 15—16
- Zhang L(张利), Yang ZJ(杨在君), Huang X(黄霞), *et al.* 2008. Study on the leaf epidermal structural characters of *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia* from Sichuan (丹参及四川鼠尾草属植物叶表皮微形态研究) [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Edit* (四川大学学报·自然科学版), **45**(3): 674—680

(上接第 24 页 Continue from page 24)