

盾叶薯蓣四倍体与二倍体叶表皮及气孔器显微结构的比较

蒋道松^{1,2}, 周朴华^{1,2}, 梁曾恩妮¹, 李 变¹

(1. 湖南农业大学 生物科学技术学院, 长沙 410128; 2. 湖南省农业生物工程研究所, 长沙 410128)

摘要: 对盾叶薯蓣四倍体和二倍体阴叶和阳叶表皮及气孔器的显微形态结构进行了比较。结果显示: 叶片表皮细胞及气孔器的形态结构因染色体倍性及光照的不同而存在明显差异。表皮细胞有规则多边形与不规则细胞壁内褶 2 种类型; 气孔器为典型的双子叶植物无规则型气孔器, 仅分布在下表皮。四倍体表皮细胞密度、气孔器密度及气孔指数平均值分别为 476.28 ± 6.87 个 $\cdot \text{mm}^{-2}$ 、 78.22 ± 3.1 个 $\cdot \text{mm}^{-2}$ 、14.11, 较二倍体的分别小 4.60%、17.95% 和 11.98%。前者气孔器长、宽及保卫细胞宽度平均值分别为 $32.78 \pm 2.09 \mu\text{m}$ 、 $26.07 \pm 1.55 \mu\text{m}$ 、 $9.63 \pm 1.14 \mu\text{m}$, 较后者的分别大 10.73%、3.90% 和 18.01%, 差异极显著。前者阴叶的较其阳叶的分别大 5.77%、6.00%、8.72%; 后者的则分别大 1.72%、1.74%、2.41%。前者叶片保卫细胞中的叶绿体数目为 23.93 ± 3.19 个, 较后者的多 74.00%。表皮细胞及气孔器密度、气孔指数, 气孔器大小, 保卫细胞叶绿体数目、尤其是保卫细胞宽度, 可作为倍性鉴定的参考依据。四倍体高产有其良好的叶片结构基础。

关键词: 盾叶薯蓣; 二倍体; 四倍体; 表皮; 气孔器; 保卫细胞; 显微结构

中图分类号: Q944 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2008)04-0427-04

Comparison on microstructures of epidermis and stomatal apparatus of leaf between tetraploid and diploid of *Dioscorea zingiberensis*

JIANG Dao-Song^{1,2}, ZHOU Pu-Hua^{1,2}, LIANGZENG En-Ni¹, LI Luan¹

(1. College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Hunan Agricultural Biotechnology Institute, Changsha 410128, China)

Abstract: Morphology and microstructure of epidermis and stomatal apparatus in guard cell of sunny leaves and shady ones between diploid and tetraploid *Dioscorea zingiberensis* have been comparatively studied. The results are as follows: there are distinctly differences on their morphology and microstructure between diploid and tetraploid, sunny leaf and shady one. There are two morphological types of epidermal cells; regular polygon epidermis and irregular meander configuration ones. The stomatal apparatus, which exist only in under epidermis, is irregular type of stomatal apparatus as that of typical dicotyle. The mean densities of epidermic cells and stomatal apparatus, stomatal index of tetraploid, which are 476.82 ± 6.87 cells $\cdot \text{mm}^{-2}$, 78.22 ± 3.1 units $\cdot \text{mm}^{-2}$ and 14.11 respectively, is smaller by 4.60%, 17.95% and 11.98% respectively than that of diploid. But the even length and width of stomatal apparatus, width of guard cell of the former, which are $32.78 \pm 2.09 \mu\text{m}$, $26.07 \pm 1.55 \mu\text{m}$, $9.63 \pm 1.14 \mu\text{m}$ respectively, is larger by 10.73%, 3.90% and 18.01% than that of the latter respectively, and the difference is all at extremely distinct level. That of shady leaf of the former is larger by 5.77%, 6.00% and 8.72% respectively than that of sunny one, and

收稿日期: 2006-11-06 修回日期: 2007-03-01

基金项目: 国家科技部科技成果推广项目(OZEFN214300459); 湖南省“十五”重点科技攻关项目[Supported by Popularization Project of Science and Technology Achievements, National Ministry of Science and Technology (OZEFN214300459); Provincial Key Scientific and Technological Project of Hunan Science and Technology Department During the 10th Five-year Plan Period]

作者简介: 蒋道松(1963-), 男, 湖南绥宁县人, 博士, 副教授, 从事资源植物学研究, (E-mail) roadpine@163.com.

the latter by 1.72%, 1.74% and 2.41% respectively. The chloroplast numbers in guard cell of stoma of tetraploid are 23.93 ± 3.19 , 74.00% more than that of diploid. The densities of epidermic cell and stoma, stomatal index, size of stoma, chloroplast numbers in guard cell, especially the width of guard cell can be used to identify the tetraploid and diploid. The leaf structure of tetraploid is good for high yield.

Key words: *Dioscorea zingiberensis*; diploid; tetraploid; epidermis; stomatal apparatus; guard cell; microstructure

盾叶薯蓣 (*Dioscorea zingiberensis*) 为薯蓣科 (Dioscoreaceae)、薯蓣属 (*Dioscorea*) 根状茎组多年生缠绕草本植物, 为我国特产 (中国植物志编委会, 1985)。其根状茎含有合成甾体激素类药物的重要起始成分薯蓣皂苷元 (diosgenin), 含量为 1.0%~16.15%, 平均约 2.5% (丁志遵等, 1983; 徐成基, 2000)。但目前栽培的盾叶薯蓣根茎的薯蓣皂苷元含量仅为 0.8%~1.2%, 二年生根茎平均产量约为 $1.54 \times 10^4 \sim 2.25 \times 10^4 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。笔者通过离体培养及化学诱变技术, 培育出薯蓣皂苷元含量高 (2.966%)、根状茎产量高 ($7.098 \times 10^4 \sim 9.936 \times 10^4 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$)、抗逆性 (高温、干旱、低温) 强, 且耐肥、抗衰老的同源四倍体新种质“XHJ-401”。为探讨其高产与高抗机理, 进行了本实验。通过对表皮细胞及气孔器的形态特征与染色体倍性及环境因子的相关性分析, 可对多倍化及环境造成的形态学效应进行充分了解。

1 材料与方 法

1.1 材 料

取材自湖南省农业大学生物科学技术学院试验基地。盾叶薯蓣二倍体引种于湖南省桃源县, 盾叶薯蓣四倍体 XHJ-401 由湖南省农业生物工程研究所细胞工程实验室培育, 系采用前者雄株为外植体, 经离体化学诱变筛选获得。

1.2 方 法

光学显微标本制备与观察: 取盾叶薯蓣四倍体和二倍体发育正常的成熟叶片 (下数第五叶), 撕取叶片近中部的下表皮, FAA 固定, 酒精 (50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、100%) 梯度脱水, 制成半永久装片; 分阴叶 (实验室盆栽散射光下的叶片) 和阳叶 (实验地中栽培的阳光直射下的叶片), 撕取下数第五叶 (成熟叶) 和第三叶 (幼叶) 叶片近叶片中部的下表皮, 各类叶片取 5 片, 分别制成 5 张临时装片制片。荧光摄影显微镜 (BA400) 下观察并拍照。

表皮细胞及气孔器的密度观测: 分别在 10 倍目

镜、10 倍物镜下, 观察盾叶薯蓣四倍体和二倍体各 5 个制片、10 个视野 ($\times 100, 561\ 227.8 \mu\text{m}^2$) 中的表皮细胞及气孔器的数目, 并计算出平均每个视野中的表皮细胞及气孔器的数目, 进而分别计算出其气孔指数。气孔指数计算公式为: $I = S / (S + E) \times 100$ 。(其中, I : 气孔指数; S : 一定面积内气孔器的数目; E : 一定面积内表皮细胞的数目)。

气孔器大小观测: 分别在 10 倍目镜和 40 倍物镜下, 用 Motic Images Advanced3.2 软件分别测量盾叶薯蓣四倍体和二倍体叶下表皮各 5 个制片共 100 个气孔器的气孔长、宽及保卫细胞的宽度, 求出其平均值。

气孔器保卫细胞叶绿体数比较: 取盾叶薯蓣四倍体和二倍体植株的成熟叶片下表皮, 制成临时装片; I-KI 溶液染色, 叶绿体呈黑色; 在 $\times 1\ 600$ 油镜下观察叶片下表皮气孔器的两个保卫细胞内的叶绿体数, 随机观察 20 个气孔器、40 个保卫细胞, 记数统计。

2 实验结果

2.1 表皮细胞及气孔器的密度

在荧光摄影显微镜下, 对 5 个制片 10 个视野 ($\times 100, 561\ 227.8 \mu\text{m}^2$) 观察, 结果见表 1。所用术语均采用 Baranova (1983) 和 Wilkimson (1979) 的描述。由表 1 可知, 四倍体与二倍体气孔器平均密度分别为 78.22 ± 3.1 个 $\cdot \text{mm}^{-2}$ 、 95.33 ± 3.7 个 $\cdot \text{mm}^{-2}$, 前者较后者小 17.95%; 其表皮细胞平均密度分别为 476.28 ± 6.87 个 $\cdot \text{mm}^{-2}$ 、 499.26 ± 6.48 个 $\cdot \text{mm}^{-2}$, 前者较后者小 4.60%。

根据表 1 计算, 四倍体气孔指数为 $I_{4n} = 14.11$, 二倍体为 $I_{2n} = 16.03$; 前者较后者小 11.98%。

2.2 气孔器大小

在 10×40 倍视野下, 用 Motic Images Advance12.2 软件分别测量 2N 和 XHJ-401 两种叶各 5 个制片 50 个气孔器的长、宽及保卫细胞的宽度, 数据见表 2。由表 2 得知, XHJ-401 叶的气孔器的长与宽、保卫细胞宽度的平均值分别为 $32.779 \mu\text{m}$ 、

表 1 盾叶薯蓣四倍体与二倍体叶片的平均表皮细胞及气孔器数目

Table 1 Numbers of epidermis cells and stoma of leaves between diploid and tetraploid of *D. zingiberensis*

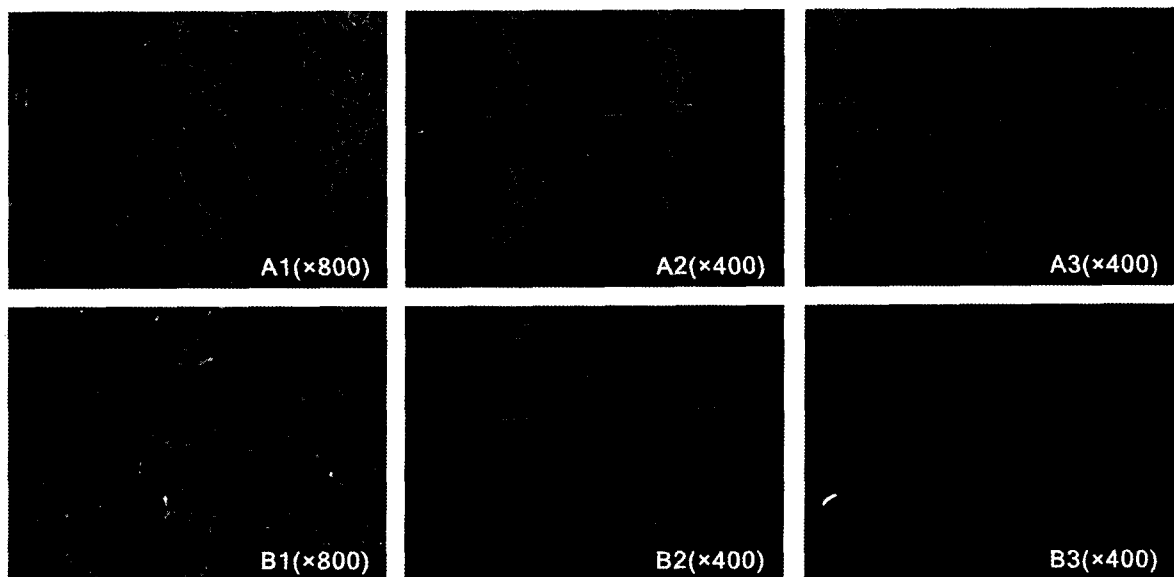
气孔器平均数目(个·mm ⁻²) Average number of stoma per mm ²	表皮细胞平均数目(个·mm ⁻²) Average number of epidermis cells per mm ²			
	四倍体 Tetraploid	二倍体 Diploid	四倍体 Tetraploid	二倍体 Diploid
每视野平均数 Average/ken	43.9±3.1	54.3±3.7	267.3±6.87	279.1±6.48
平均密度 Average density	78.22±3.1	95.33±3.7	476.28±6.87	499.26±6.48

表 2 盾叶薯蓣四倍体与二倍体阳性及阴叶下表皮气孔器的大小

Table 2 Size of stomatal apparatus of sunny and shady leaves of tetraploid and diploid *D. zingiberensis*

叶片类型 Types of leaves	气孔器长 SL(μm)		气孔器宽 SW(μm)		保卫细胞宽 GW(μm)	
	四倍体 Tetraploid	二倍体 Diploid	四倍体 Tetraploid	二倍体 Diploid	四倍体 Tetraploid	二倍体 Diploid
阳叶 Sunny leaves	31.860±2.195	29.354±2.692	25.312±1.795	24.866±2.298	9.226±1.157	8.062±0.912
阴叶 Shady leaves	33.698±1.982	29.860±2.598	26.830±1.310	25.318±2.390	10.030±1.127	8.256±1.094
平均 Average	32.779±2.089	29.603±2.645	26.071±1.553	25.092±2.344	9.628±1.142	8.159±1.003

Note: SL-length of stoma; SW-width of stoma; GW-width of guard cell.



图版 I 1. 二倍体阳叶下表皮(×800); 2. 二倍体阴叶下表皮(×400); 3. 二倍体幼叶下表皮(×400); 4. 四倍体阳叶下表皮(×800); 5. 四倍体阴叶下表皮(×400); 6. 四倍体幼叶下表皮(×400)。CH:叶绿体; CW:细胞壁; EP:表皮细胞; GC:保卫细胞; SA:气孔器; VA:液泡。

Plate I 1. Under epidermis of sunny leaf of diploid; 2. Under epidermis of shady leaf; 3. Under epidermis of young leaf of diploid; 4. Under epidermis of sunny leaf of traploid; 5. Under epidermis of shady leaf of tetraploid; 6. Under epidermis of young leaf of tetraploid. CH:chloroplast; CW:cell wall; EP:epidermic cell; GC:guard cell; SA:stomatal apparatus; VA: vacuole.

26.071 μm、9.628 μm,较二倍体叶分别大 10.729%、3.902%和 18.005%。分别对 SL、SW、GW 进行 u 检验,得 $u_1=9.06, u_2=3.5, u_3=10.8$ 。查表得 $|u| \geq u_{0.01}$ 。盾叶薯蓣四倍体 XHJ-401 和二倍体叶片下表皮气孔器平均长度、平均宽度和单个保卫细胞的平均宽度差异极显著。阴叶和阳叶之间:XHJ-401 阴叶的气孔器长与宽、保卫细胞宽度平均值分别为 33.698 μm、26.830 μm、10.030 μm,较其阳叶的分别大 5.769%、5.997%和 8.715%;二倍体阴叶的分别为

29.860 μm、25.318 μm、8.256 μm,较其阳叶的分别大 1.724%、1.736%、2.406%。

2.3 叶下表皮及气孔器的显微形态结构观察

盾叶薯蓣四倍体和二倍体的上表皮均无气孔器,下表皮由排列紧密的表皮细胞与气孔器组成。表皮细胞:多边形(图版I:1,3,6)或不规则形(图版I:2,4,5),二倍体表皮细胞的密度较四倍体的大;可见细胞壁、细胞核、细胞质和中央大液泡,不含叶绿体;二倍体幼叶和阳叶下表皮细胞多为较规则多边形(图版I:

1,3);阴叶下表皮细胞为不规则形,细胞壁内褶明显(图版I:2);四倍体阳叶或成熟叶下表皮细胞为不规则形,细胞壁内褶不明显(图版I:4、5),而幼叶下表皮细胞则为规则多边形(图版I:6)。气孔器:为典型的双子叶植物无规则型气孔器(图版I),由2个肾形保卫细胞和1个气孔构成,保卫细胞靠气孔一侧的细胞壁明显加厚,含有一定数目的叶绿体;四倍体的气孔器及单个保卫细胞的大小较二倍体的均明显要大,其保卫细胞所含的叶绿体也更多、更大。

2.4 叶下表皮及气孔器保卫细胞叶绿体数目观察

盾叶薯蓣四倍体与二倍体叶下表皮气孔器保卫细胞的叶绿体数目观察结果见图1。盾叶薯蓣四倍体叶表皮气孔器一对保卫细胞中的叶绿体数目为 23.93 ± 3.19 个,二倍体的叶绿体数目为 13.79 ± 2.81 个。前者的叶绿体数目为后者的1.74倍,差异显著。

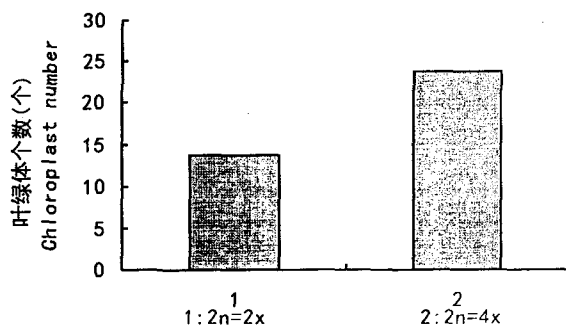


图1 叶绿体个数比较

Fig. 1 Comparison of chloroplast number

3 分析与讨论

3.1 气孔器密度、大小与倍性及光照的关系

表皮细胞及气孔器的形态结构特征、气孔器大小与染色体倍性、生态因子的相关性分析,多倍化造成的形态学效应是当前环境植物学研究的热点之一。气孔器的大小与密度常作为染色体倍性检验的指标之一。在本研究中,四倍体的气孔器密度与气孔指数较二倍体的分别小17.95%和11.98%;四倍体叶下表皮气孔器总平均长度与宽度、保卫细胞宽度较二倍体的分别大10.729%、3.902%和18.005%,差异极显著。这些结果表明:(1)多倍化对气孔器大小产生了显著的影响;(2)采用这些指标进行倍性鉴定是可行的。(3)保卫细胞的大小、尤其是其宽度,在二倍体与

四倍体之间的差异最为突出,而气孔器宽度的差异却相对小得多,这是因为其平均值受到气孔关闭程度的影响较大,因此,作者认为直接采用保卫细胞的宽度平均值这个指标,能更快、更准确地进行倍性检验。

气孔器的大小、特别是保卫细胞的大小,受光照等环境因子影响较大。四倍体阴叶的气孔器的长、宽、保卫细胞宽度较其阳叶的分别大5.769%、5.997%和8.715%;二倍体阴叶的较其阳叶的分别大1.724%、1.736%、2.406%。这表明:(1)对于本种来说,光照等环境因子对气孔器大小产生的影响要小于多倍化对其产生的影响,对多倍体的影响大于对二倍体的影响;(2)不论是四倍体还是二倍体,光照对保卫细胞宽度值的影响要大于其长度值及气孔器宽度值。因此,作者认为对于利用气孔器大小作为全球气候变迁的一个主要指标进行统计学检验是可行的,但作者同时认为,利用保卫细胞的大小、尤其是保卫细胞的宽度平均值进行统计学分析更为科学可靠。

3.2 表皮及气孔器的显微形态结构与倍性及光照的关系

盾叶薯蓣四倍体和二倍体叶片的表皮细胞起初均为规则多边形,随着细胞的长大,细胞壁出现内褶,阴叶的细胞壁内褶较阳叶的更为明显,二倍体较四倍体的内褶要明显得多,这些特征可作为本种倍性鉴定的新的参考依据之一,但如何进行指标量化,需要进一步探讨。

3.3 保卫细胞叶绿体数目与植株倍性的关系

盾叶薯蓣四倍体一对保卫细胞中的叶绿体数目为二倍体的1.74倍,差异显著。因此,利用保卫细胞中叶绿体的数目,可快速而较准确地进行植株倍性鉴定;同时也在一定程度上说明了多倍体植株的光合性能优于二倍体植株,其生物产量也可能因此而提高。

3.4 叶表皮及气孔器的显微形态结构与光合性能的关系

盾叶薯蓣为偏阴性的耐荫植物。其表皮细胞及气孔器形态特征、气孔器及保卫细胞的大小、保卫细胞中叶绿体大小数目,与染色体倍性的变化及光照等生态因子均有密切的相关性。光照减弱的荫蔽环境,气孔器数目减少,但气孔、保卫细胞及其所组成的气孔器明显增大,其所含叶绿体的大小及数目提高,光合产物总量得到有效补偿。四倍体与二倍体相比,其器官的巨型特征,与以往多数报道结果一致(下转第450页 Continue on page 450)

束花石斛种质资源的标准化收集整理结果显示,不同居群束花石斛的茎直径和长度,茎形状以及花的颜色和形状均有所差异。来自云南景洪的束花石斛茎长而粗壮,茎圆柱形,两端一般不会变细,花较大,唇瓣上的两个斑点呈深紫色。而采自于广西玉林和百色地区的束花石斛茎比较短,两端逐步狭窄,呈纺锤形(与玫瑰石斛极为相似),花较小,唇瓣上的两个斑点呈浅紫色。聚类分析结果表明,云南思茅居群和云南文山居群、贵州安龙居群和贵州则戎居群的遗传距离较小,说明两者之间的亲缘关系较近。从地理位置而言,云南思茅和文山,贵州安龙县和则戎乡的地理位置都很近。相反,云南景洪居群与其它居群的亲缘关系较远,景洪位于云南省南部,在地理位置上与其它居群间隔较远,说明束花石斛居群间的亲缘关系与其地理位置有一定的联系。至于束花石斛遗传基因与其形态变异和环境因素的相关性还有待用进一步研究。

参考文献:

- Bao YH(包英华), Bai Y(白音), Tan QH(谭庆辉), et al. 2007. Comparison of methods of genomic DNA extraction from *Dendrobium loddigesii* (美花石斛基因组 DNA 提取方法的比较)[J]. *J Trop Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), 15(2): 147-151
- Bai Y(白音), Bao YH(包英华), Wang WQ(王文全), et al. 2007. RAPD analysis on germplasm resources in different populations of *Dendrobium loddigesii* (不同居群美花石斛种质资源的 RAPD 分析)[J]. *Chin Trad Herb Drugs* (中草药), 38(5):

748-751

- Chen XM(陈晓梅), Guo SX(郭顺星). 2001. Advances in the research of constituents and pharmacology of *Dendrobium* (石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展)[J]. *Nat Product Res Development* (天然产物研究与开发), 13(1): 70-74
- Ding G, Ding X Y, Shen J, et al. 2005. Genetic diversity and molecular authentication of wild populations of *Dendrobium officinale* by RAPD[J]. *Acta Pharm Sic* (药学学报), 40(11): 1 028-1 032
- Ding XY(丁小余), Xu LS(徐璐珊), Wang ZT(王峥涛), et al. 2002. Molecular authentication of *Dendrobium chrysanthum* from its allied species of *Dendrobium* (束花石斛及其相似种的 DNA 分子鉴别)[J]. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 27(6): 407-411
- Li S(李璧), Wang CL(王春兰), Guo SX(郭顺星), et al. 2005. Advances in studies on chemical components and pharmacology of epiphytic type medicinal plants in the Orchid family (附生型兰科药用植物化学成分及药理活性研究进展)[J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 30(19): 1 489-1 496
- Shen J, Ding XY, Liu DY, et al. 2006. Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating Populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo[J]. *Bio Pharm Bull*, 29(3): 420-422
- Shen Y(沈颖), Xu C(徐程), Wan XF(万小凤), et al. 2005. Application of ISSR-PCR to identification of different *Dendrobium* species (ISSR-PCR 在石斛种间鉴别中的应用)[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 36(3): 423-427
- Yang L(杨莉), Wang Y(王云), Bi ZM(毕志明), et al. 2004. Studies on chemical constituents of *Dendrobium chrysanthum* (束花石斛化学成分研究)[J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2(5): 280-282
- Ziekienlcz E, Rafashl A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by Simple Sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 20: 176-183

(上接第 430 页 Continue from page 430)

(何立珍等, 1983; 黄济明, 1983; 宋文昌等, 1992)。多倍化后, 耐荫特征更加突出。其叶片单位面积内的气孔器数目减少, 但气孔、保卫细胞及其所组成的气孔器明显增大, 使其呼吸作用得到改善, 并更利于对 CO₂ 和水分的调节; 其保卫细胞中含有比二倍体更多、更大的叶绿体, 这与其光合效率和功能的提高有关。四倍体除能较好地利用直射光外, 对环境散射光或漫射光也有更好的利用。由此可见, 其形态结构特征具有较大的可塑性。因此, 四倍体高产有其良好的叶片结构基础。

参考文献:

- 丁志遵, 唐世蓉, 秦慧贞, 等. 1983. 甾体激素药源植物[M]. 北京: 科学出版社
- 中国植物志编委会. 1985. 中国植物志(第 16 卷第 1 分册)

[M]. 北京: 科学出版社: 60-105

- 何立珍, 刘选明, 周朴华. 1993. 黄花菜 HAC 一大花长嘴子花同源四倍体选育[J]. *湖南农业科学*, (4): 23-24
- 徐成基. 2000. 中国薯蓣资源[M]. 成都: 四川科学技术出版社
- 黄济明. 1983. 百合组织培养和试管内诱发多倍体试验[J]. *园艺学报*, (2): 125-127
- Baranova MA. 1983. Study on the laterocytic stomtotype in angiosperms[J]. *Brittonia*, 35(1): 93-102
- Song WC(宋文昌), Zhang YH(张玉华). 1992. Rice tetraploidy and its effect on agronomic traits and nutritional constituents (水稻四倍化及其对农艺性状和营养成分的影响)[J]. *Acta Agron Sin* (作物学报), (2): 137-143
- Ren FL(任凤莲), Liu Y(刘咏), Yu WF(禹文峰). 2006. Qualitative and quantitative analysis of diosgenin distilled from *Dioscorea zingiberensis* (黄姜中薯蓣皂甙元的提取及定性定量分析)[J]. *Guihaia* (广西植物), 26(6): 684-686
- Wilkinson HP. 1979. The plant surface (mainly leaf)[M]. Oxford: Clarendon Press