

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2011.05.020

## 长春花叶片发育过程中气孔密度 和气孔指数的动态变化

杨颖, 王永飞, 马三梅\*

(暨南大学生物工程学系, 广州 510632)

**摘要:** 对长春花叶片近轴面和远轴面上的气孔密度和气孔指数在不同发育阶段的动态变化进行了研究。结果表明: 在各个发育阶段, 近轴面上的气孔以叶脉两侧居多, 远轴面上的气孔则在整个叶片上均匀分布。将一个枝条上的10对真叶按发育顺序界定为10个发育阶段, 即从枝条的顶端到基部, 分别将第10、第9、第8……第1节位的叶片定义为第1、第2、第3……第10发育阶段。长春花叶片长度在开始的前3个阶段增加迅速, 在第3阶段时叶片长度可达(4.5±0.4) cm。在开始的前3个阶段, 表皮细胞主要进行细胞分裂和细胞扩大。从第4阶段开始, 表皮细胞的分裂和扩大基本停止。从第4阶段到第8阶段, 气孔密度和气孔指数基本保持稳定。在最后2个阶段即第9和第10阶段, 无论是近轴面还是远轴面都出现气孔指数和气孔密度骤增的现象。

**关键词:** 长春花; 气孔密度; 气孔指数; 表皮细胞数; 发育阶段

**中图分类号:** Q944 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)05-0674-05

## Dynamic changes of stomatal density and stomatal index during the leaf development in *Catharanthus roseus*

YANG Ying, WANG Yong-Fei, MA San-Mei\*

(Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** The present paper focused on dynamic changes of stomatal density and stomatal index during the developmental stage of *Catharanthus roseus* leaves. It was found that at all developmental stages, stomata mainly distributed along veins on adaxial surface, while uniformly distributed on abaxial surface of the whole blade. The ten pairs of leaves numbered from bottom to top in one shoot were divided into ten developmental stages which were numbered from top to bottom, e. g. leaves in the 10th nod were in stage I, the rest might be deduced by analogy. Due to cell division and cell enlargement during the first three stages, the leaves of *C. roseus* grew rapidly. In stage III, the leaf length could reach (4.5±0.4) cm. Cell division and cell enlargement basically stopped at stage IX. Stomatal density and stomatal index kept stable from stage IX to stage VIII. In the last two stages-stage IX and X, stomatal density and stomatal index increased abruptly.

**Key words:** *Catharanthus roseus*; stomatal density; stomatal index; epidermal cell number; developmental stage

长春花 (*Catharanthus roseus*) 为夹竹桃科 (Apocynaceae) 长春花属 (*Catharanthus*) 的植物, 广泛分布于世界各地。我国广东、广西、云南、海南、贵州、四川以及江浙一带均有栽培。长春花的叶对生,

收稿日期: 2010-06-13 修回日期: 2011-05-04

基金项目: 国家自然科学基金 (81073004); 广东省科技攻关项目 (2011B020303006) [Supported by National Natural Science Foundation of China (81073004); Key Project for Science and Technology Development of Guangxi Province (2011B020303006)]

作者简介: 杨颖 (1985-), 女, 山东烟台人, 硕士研究生, 主要从事细胞形态研究, (E-mail) mimanqingxiang@163.com.

\* 通讯作者: 马三梅, 女, 博士, 主要从事植物学研究, (E-mail) msmwdw@163.com.

枝条略有分支,花期特长,从春到秋开花不间断,所以有“日日春”之美名。长春花姿态优美,适合布置花坛和作盆栽观赏。此外,长春花还是一种重要的抗癌植物。迄今已从长春花中分离出 100 余种生物碱(于兆海等,2009),其中长春碱(Vincalculoblastine)与长春新碱(vincristine)具有极显著的抗肿瘤作用,是目前国际上应用最多的抗癌植物药源。

气孔是表皮上的特化结构,控制着植物与大气中的水分和气体交换。气孔最常见于叶片上,一般又以叶片远轴面上居多。同一叶片不同部位的气孔密度也存在差异(Poole 等,1996)。一般情况下气孔密度从叶片中脉部分到叶片边缘逐渐增加(王碧霞等,2010;朱燕华等,2011)。但也有例外,如吕洪飞(2000)以鸭跖草科的 3 种植物为材料研究叶片上气孔的分布特征时,发现鸭跖草(*Commelina communis*)叶片近轴面中部和基部的气孔主要分布在主脉和支脉附近,而在脉间偶有分布;紫竹梅(*Setcreasea purpurea*)和吊竹梅(*Zebrina pendula*)叶片的近轴面则无气孔分布。由此看来,不同植物叶片上气孔的分布特征差异较大,并无统一的分布规律。植物的气孔形状是由物种自身的遗传物质决定的,同时又与生长环境相适应(朱燕华等,2011)。作为一种很有价值的药用植物,长春花叶片近轴面和远轴面上气孔的分布以及叶片发育过程中气孔密度、气孔指数的动态变化未见报道。对长春花叶片上气孔动态变化的研究有助于了解气孔在高等植物发育过程中所起的作用,从而为光合植物的生理学、形态学研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

将长春花种子用  $\text{HgCl}_2$  消毒,播种于盛有蛭石的穴盘中。待种子萌发后,选取 2 对真叶展开的幼苗移栽到塑料盆中,每盆 2 株,保持环境温度( $28 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ 。待第 10 对真叶展开时开始实验。

### 1.2 方法

随机取第 10 节位叶片长度约为 1.0 cm 的枝条。将一个枝条上的 10 对真叶按发育顺序界定为 10 个发育阶段。即从枝条的顶端到基部,分别将第 10、第 9、第 8……第一节位的叶片定义为第 1、第 2、第 3……第 10 发育阶段。取 30 个枝条进行实验,在近轴面、远轴面的脉间、远轴面的叶脉两侧取样,

在每对真叶的 3 个取样部位各统计 50 个视野。实验重复 3 次。统计每个视野中的气孔数和表皮细胞数。计算出气孔密度和气孔指数,并用 Sony W5 数码相机拍照。气孔密度 = 一个视野中的气孔数目 / 视野面积,气孔指数 = 气孔数 / (气孔数 + 表皮细胞数)  $\times 100\%$ 。40 $\times$ 10 的视野面积为 0.159  $\text{mm}^2$ ,计算方法为  $\pi(d/2)^2$ ,其中  $d = 0.45$  mm。用 SPSS 13.0 软件对数据结果进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同发育阶段叶片长度的比较

第 1 到第 10 阶段叶片的平均长度依次为 1.0  $\pm$  0.2 cm, 3.2  $\pm$  0.3 cm, 4.5  $\pm$  0.4 cm, 4.8  $\pm$  0.4 cm, 4.9  $\pm$  0.4 cm, 5.1  $\pm$  0.3 cm, 5.4  $\pm$  0.3 cm, 5.4  $\pm$  0.2 cm, 5.6  $\pm$  0.3 cm, 6.1  $\pm$  0.3 cm(图 1)。叶片长度在开始的 3 个阶段增加迅速,从第 4 阶段开始叶片长度增加变缓。

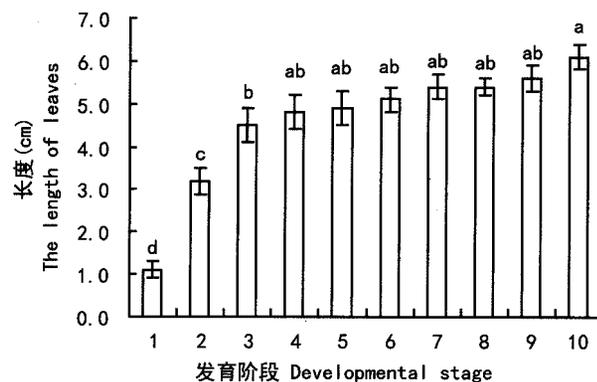


图 1 不同发育阶段长春花叶片的长度  
Fig. 1 Lengths of *Catharanthus roseus* leaves in different developmental stages

### 2.2 长春花叶片上的气孔分布特征

长春花叶片气孔的周围通常有 3~4 个副卫细胞。这些副卫细胞与保卫细胞构成不等型气孔复合体(图 3:A)。在叶片远轴面,气孔在叶脉两侧和脉间处均匀分布(图 2:A)。而在近轴面,气孔以叶脉两侧居多(图 2:B)。叶脉处的细胞呈长条形,其长轴与叶片长轴平行;叶脉处未见保卫细胞。在叶片发育的第一个阶段,近轴面叶脉两侧可看到很多呈三角形的、小的拟分生组织和椭圆形的保卫细胞母细胞(图 3:B),而此时脉间处还未出现气孔甚至拟分生组织。在阶段 I,叶片远轴面上也可见很多拟分生组织和保卫细胞母细胞,此阶段中发育完成的气孔呈圆形。而从

阶段3开始,叶片上的气孔呈椭圆形。

### 2.3 气孔密度和气孔指数

如图4所示,无论是叶片近轴面还是远轴面,气孔密度和气孔指数均呈现“先降低后保持平稳,最后升高”的变化趋势。

### 2.4 表皮细胞的特征和动态变化

在叶片生长的前3个阶段,近轴面的表皮细胞呈不规则多边形(图3:B),后7个阶段逐渐发展为浅波形(图3:C)。如图5所示,叶脉两侧和脉间处的表皮细胞数目均在阶段1最多,并且都从阶段4

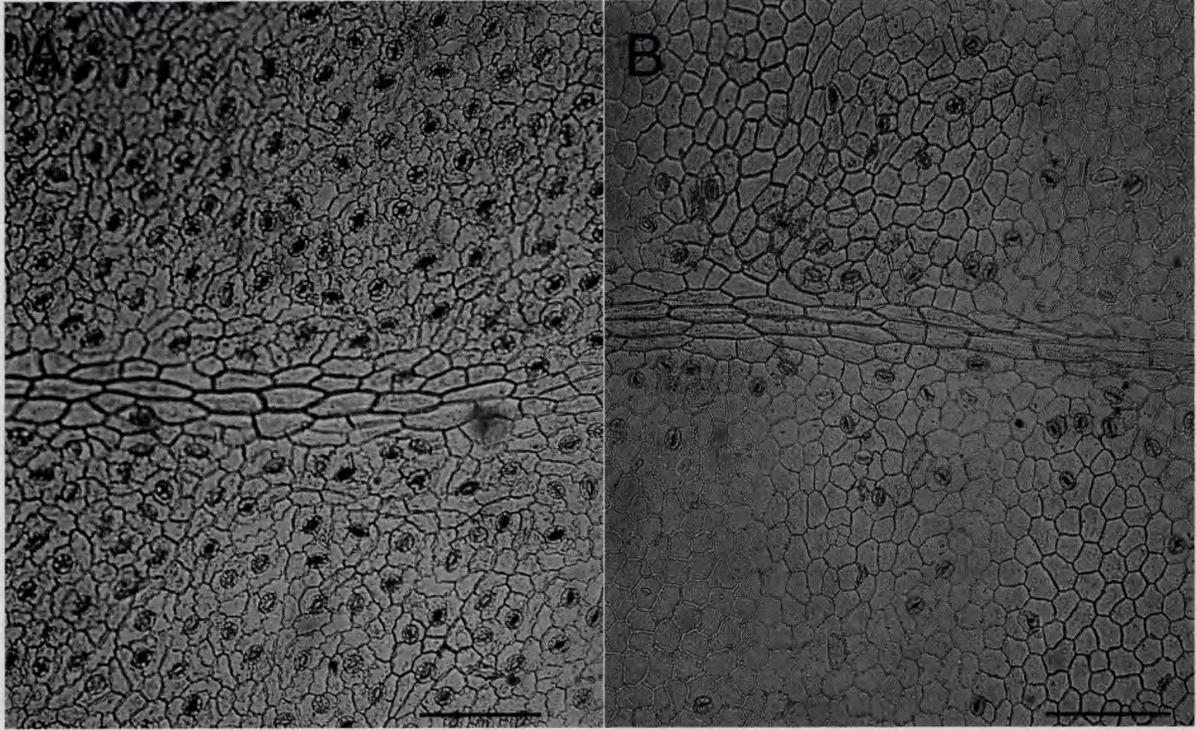


图2 长春花叶片上气孔的分布特征

Fig. 2 The distribution characteristics of stomata on leaves of *Catharanthus roseus*

A. 叶片远轴面; B. 叶片近轴面。Bar=100  $\mu\text{m}$

A. the abaxial surface of leaves; B. the adaxial surface of leaves.

开始保持稳定。

阶段1,表皮细胞的平皮切面呈不规则的五边形或者六边形。随着叶片的生长,表皮细胞的侧壁逐渐变的凹凸不平,但是互相紧密嵌合,表皮细胞的平皮切面呈深波状(图3:D)。表皮细胞数目在阶段1出现最大值,从阶段3开始保持稳定不再发生显著的变化。

## 3 讨论

在阶段1近轴面的脉间处并未发现气孔甚至是拟分生组织的存在,从阶段2到阶段10,同一叶片叶脉两侧的气孔密度和气孔指数都比脉间处要高,董天英等(1992)曾报道过10种常见植物叶片上的气孔的分布状况,未发现叶脉两侧和脉间处气孔密

度的差异。而Salisbury(1928)却发现生活在英国森林地区的几种植物(*Statice binervosa*, *Scabiosa succisa*, *Stellaria holostea*, *Adoxa moschatellina*),其气孔指数从叶尖到叶基逐渐变小。可见,不同物种叶片上的气孔分布存在很大差异。

叶片由阶段1生长到阶段2,其长度增加了190%,而叶片远轴面的表皮细胞数目只降低21.2%。叶片由阶段2生长到阶段3,其长度增加40.7%,表皮细胞数目降低37.6%。这表明表皮细胞的扩大和分裂主要发生在叶片发育的早期。先是细胞分裂占主导,当表皮细胞达到一定的数目后,细胞扩大占主导。叶片生长到阶段3,细胞扩大和细胞分裂过程均变得微弱。此时叶片长度的增加也变的缓慢。可见叶片面积的增加主要依赖于表皮细胞的扩大和分裂。通常气孔只占叶面积的0.5%~1%,

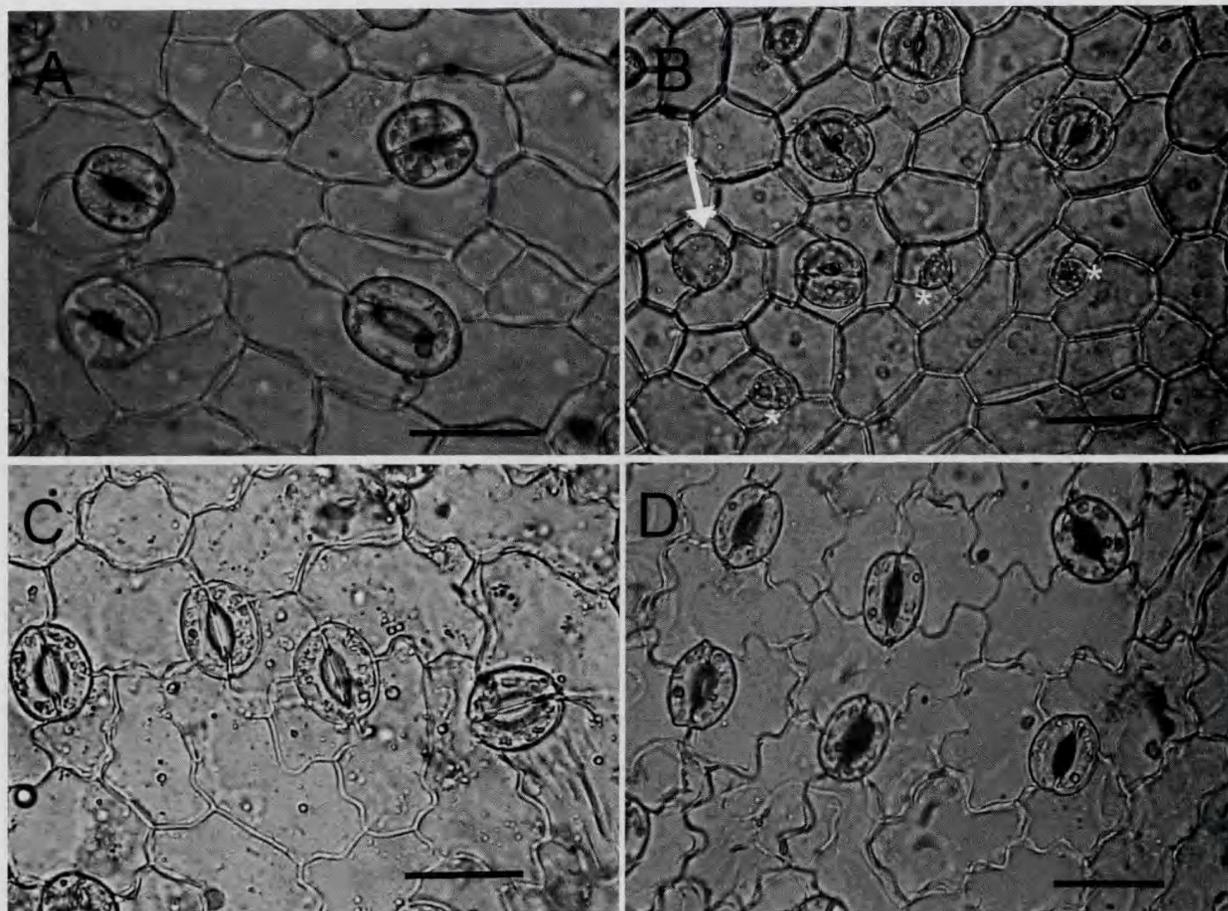


图 3 长春花叶片上的气孔和表皮细胞

Fig. 3 The stomata and epidermal cells in *Catharanthus roseus* leaves

- A. 在阶段 4 时远轴面上的成熟气孔; B. 在阶段 1 时近轴面上的气孔; 白色 \* 表示拟分生组织, 白色箭头表示保卫细胞母细胞;  
 C. 在阶段 10 时近轴面浅波形的表皮细胞; D. 在阶段 10 时远轴面深波形的表皮细胞。  
 A. the mature stomata of abaxial surface in stage IV; B. the stomata of adaxial surface in stage I. White \* is the meristemoid cell and white arrow is the guard mother cells; C. epidermal cells with slightly waved anticlinal wall of adaxial surface in stage X; D. epidermal cells with strongly waved anticlinal wall of abaxial surface in stage X. Bar=25  $\mu\text{m}$

所以它们在叶片面积增大上所起的作用是微弱的。

当叶片生长到后 3 个阶段, 在表皮细胞数目变化不显著的情况下, 气孔密度和气孔指数却开始增加, 甚至在阶段 10, 气孔密度和气孔指数的增加达到极显著的水平 ( $P < 0.01$ )。Miyazawa 等 (2006) 的研究表明杨树 (*Populus trichocarpa*  $\times$  *P. deltoides*) 的叶片生长到其最大长度一半的时候, 气孔的数目已经达到最大值, 以后表皮细胞扩大只会导致气孔密度的降低。而在本实验中, 长春花叶片上的气孔在达到稳定后又表现出显著增加的趋势。Lake 等 (2006) 研究发现在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中, 成熟叶片能感知外界环境信号, 并将这些信号传到发育中的叶子, 发育中的叶子通过调

整气孔指数或者气孔密度来响应外界的环境信号。Thomas 等 (2004) 在烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中也发现了相似的现象, 即光辐射信号由成熟叶片感知, 由发育中的叶片响应。若给予烟草成熟叶片低光处理, 则发现处理组的发育中叶片上的气孔指数和气孔密度显著低于对照组。在长春花中, 成熟叶片处于低节位, 接受强光和紫外线辐射程度较高节位的叶片低, 这是否是导致成熟叶片上气孔密度和气孔指数升高的原因还需要进一步的探究。Driscoll 等 (2006) 发现, 当外界  $\text{CO}_2$  浓度升高至正常大气中  $\text{CO}_2$  浓度的一倍后, 气孔指数升高, 但气孔密度未发生变化。这是因为表皮细胞面积和气孔器的面积都在增大。由此可知, 不同的植物靠改变

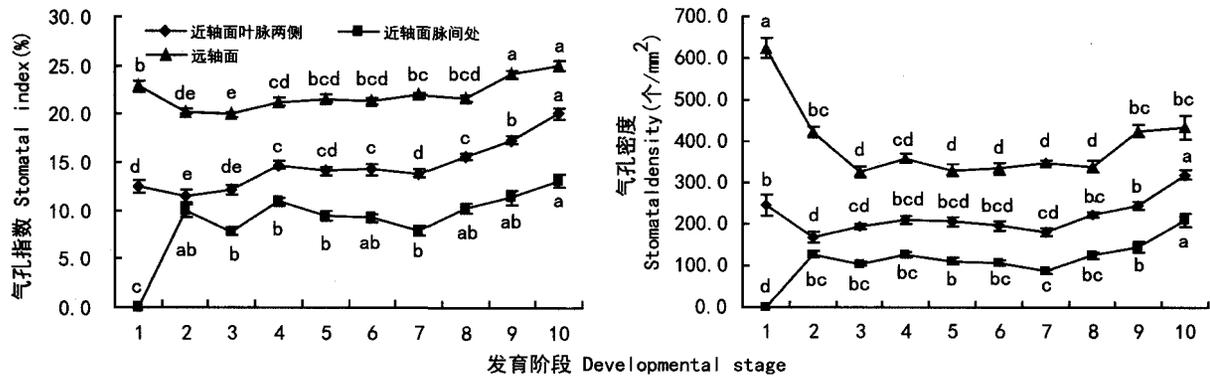


图 4 长春花叶片上的气孔密度和气孔指数的变化

Fig. 4 Stomatal density and stomatal index during the leaf development of *Catharanthus roseus*

不同的小写字母表示叶片同一部位的不同阶段在  $P=0.05$  水平上差异显著。

Difference lowercase letters represent significant differences at  $P=0.05$  in the same part of leaves.

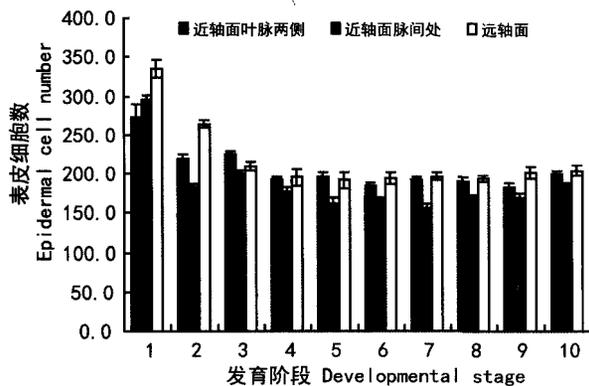


图 5 40 倍视野中的表皮细胞数目

Fig. 5 The number of epidermal cells under the 40 multiple microscope

气孔途径来适应环境的方式是多样的。

至于后 3 个阶段气孔指数和气孔密度的升高是否受叶片中内源性长春碱含量的影响还需要进一步的研究。因为长春碱是微管的特异性抑制剂,于荣等(2007)研究发现用长春碱处理离体叶片 90 min 会使气孔开度变小。长春花碱在活体中是否可以影响气孔和表皮细胞的发育目前尚无相关报道,这有待于进一步的研究。

## 参考文献:

- 于兆海,陈刚. 2009. 长春花生物碱的提取、分离、鉴定、制剂研究概述[J]. 中国药业,18(14):85-86
- 董天英,尹秀玲. 1992. 植物气孔在叶片上分布状况的观察[J]. 生物学杂志,(4):23
- Driscoll SP, Prins A, Olmos E. 2006. Specification of adaxial and abaxial stomata, epidermal structure and photosynthesis to  $CO_2$  enrichment in maize leaves[J]. *J Exp Bot*, 57(2):381-390

- Lake JA, Quick WP, Beerling DJ, et al. 2001. Signals from mature to new leaves[J]. *Nature*, 411:154
- Lv HF(吕洪飞). 2000. Comparative study on the stomatal distribution on plants *Setereasea purpurea* Boom, *Zebrina pendula* Schnizl and *Commelina communis* Linn. (紫竹梅、吊竹梅和鸭跖草气孔分布与比较)[J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 17(4):375-380
- Miyazawa SI, Livingston NJ, Turpin DH. 2006. Stomatal development in new leaves is related to the stomatal conductance of mature leaves in poplar (*Populus trichocarpa* × *P. deltoides*)[J]. *J Exp Bot*, 57(2):373-380
- Poole I, Weyers JDB, Lawson T, et al. 1996. Variations in stomatal density and index; implications of Palaeoclimatic reconstructions[J]. *Plant Cell Environ*, 19(6):705-712
- Salisbury EJ. 1928. On the causes and ecological significance of stomatal frequency, with special reference to the woodland flora [J]. *Philos T Roy Soc B*, 216(431-439):1-65
- Thomas PW, Woodward FI, Quick WP. 2003. Systemic irradiance signalling in tobacco[J]. *New Phytol*, 161(1):193-198
- Wang BX(王碧霞), Zeng YH(曾永海), Wang DY(王大勇), et al. 2010. Responses of leaf stomata to environmental stresses in distribution and physiological characteristics(叶片气孔分布及生理特征对环境胁迫的响应)[J]. *Agric Res Arid Areas* (干旱地区农业研究), 28(2):122-126, 131
- Yu R(于荣), Sun L(孙丽), Li XD(李学东). 2007. Localization of microtubule-association protein AtMAP65-1 in guard cells of *Arabidopsis*(植物微管结合蛋白 AtMAP65-1 在拟南芥气孔保卫细胞中的定位)[J]. *J Mol Cell Biol* (分子细胞生物学报), 40(3):258-240
- Zhu YH(朱燕华), Kang HZ(康宏樟), Liu CJ(刘春江). 2011. Affecting factors of plant stomatal traits variability and relevant investigation methods(植物叶片气孔形状的变异的影响因素及研究方法)[J]. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 22(1):250-256