

## 青钱柳叶片解剖结构及黄酮、三萜和多糖的组织化学定位观察

周明明<sup>a,b</sup>, 钱晨云<sup>a,b</sup>, 刘洋<sup>a,b</sup>, 方升佐<sup>a,b,①</sup>, 杨万霞<sup>a,b</sup>, 尚旭岚<sup>a,b</sup>

(南京林业大学: a. 南方现代林业协同创新中心, b. 林学院, 江苏 南京 210037)

**Observation on leaf anatomical structure and histochemical localization of flavonoids, triterpenoids and polysaccharides in leaf of *Cyclocarya paliurus*** ZHOU Mingming<sup>a,b</sup>, QIAN Chenyun<sup>a,b</sup>, LIU Yang<sup>a,b</sup>, FANG Shengzuo<sup>a,b,①</sup>, YANG Wanxia<sup>a,b</sup>, SHANG Xulan<sup>a,b</sup> (Nanjing Forestry University: a. Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, b. College of Forestry, Nanjing 210037, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2017, 26(2): 107-109

**Abstract:** Taking one-year-old seedlings of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja from three provenances (Wufeng of Hubei, Yuanling of Hu'nan and Muchuan of Sichuan) as experimental materials, the structure of leaf transverse section and histochemical localization of flavonoids, triterpenoids and polysaccharides were observed. The results show that the anatomical structure of leaf transverse section and the distribution pattern of flavonoids, triterpenoids and polysaccharides in leaf of *C. paliurus* from three provenances are generally consistent. Leaf belongs to bifacial leaf, and stomas locate on lower epidermis. The primary vein is well developed, and there is an obvious differentiation in palisade tissue and spongy tissue. Flavonoids are mainly distributed in glandular hair, epidermis, phloem and xylem, and their contents are relatively higher in phloem and xylem. Triterpenoids are mainly distributed in glandular hair, epidermis, phloem and palisade tissue. Polysaccharides are distributed in each tissue of leaf. In which, contents of triterpenoids and polysaccharides in palisade tissue are relatively higher.

**关键词:** 青钱柳; 叶片解剖结构; 黄酮; 三萜; 多糖; 组织化学定位

**Key words:** *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja; leaf anatomical structure; flavonoids; triterpenoids; polysaccharides; histochemical localization

中图分类号: Q949.735; Q944.5; Q946 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2017)02-0107-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2017.02.14

青钱柳 [*Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja] 隶属于胡桃科 (Juglandaceae) 青钱柳属 (*Cyclocarya* Iljinskaja), 为中国特有的单属植物, 具有较高的药用、材用和观赏等价值<sup>[1]</sup>; 青钱柳叶片中含有多种次生代谢成分, 具有多种药理活性<sup>[2-4]</sup>。目前, 对于青钱柳次生代谢成分的研究主要集中在提取、分离和纯化及不同种源间次生代谢成分的变化规律等方面, 其中, 已有研究者就基因型和环境对青钱柳黄酮含量变化的影响以及青钱柳叶片中三萜成分的组织化学定位进行了研究<sup>[5-6]</sup>, 但不同种源青钱柳叶片中黄酮、三萜和多糖类成分的分布是否存在差异尚不清楚。

鉴于此, 本研究采用植物解剖学和组织化学方法, 对来源于湖北五峰、湖南沅陵和四川沐川的青钱柳叶片的显微结构及叶片中黄酮、三萜和多糖的组织化学定位进行了分析, 以期青钱柳叶片中黄酮、三萜及多糖的合成和分布研究奠定基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

实验地位于江苏镇江 (东经 119°32'52"、北纬 32°16'40"), 属亚热带季风气候, 年降水量 1 000 mm, 年均温 14.1 °C, 无霜期 220 d, 空气相对湿度 75%~85%; 土壤多为砂壤土。

供试种子于 2009 年 10 月分别采自湖北五峰 (东经 110°40'13"、北纬 30°12'08")、湖南沅陵 (东经 110°22'48"、北纬 28°28'12") 和四川沐川 (东经 103°47'10"、北纬 28°58'20") 的青钱柳天然林。2010 年 3 月, 将来源于上述产地的青钱柳种子经过层积催芽后播种, 参照 Deng 等<sup>[7]</sup> 的方法进行容器育苗; 当年 6 月初移栽至实验地, 株距 40 cm、行距 50 cm。8 月 20 日, 在 3 个种源中各选择苗高和地径接近平均值的样株 5 株, 每株随机采集 4 枚新鲜成熟叶片, 用于显微结构观察和

收稿日期: 2016-06-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31270673); 江苏省第四期“333 工程”培养资金资助项目

作者简介: 周明明 (1992—), 女, 湖北鄂州人, 硕士研究生, 主要从事人工林定向培育研究。

①通信作者 E-mail: fangsz@njfu.edu.cn

组织化学定位分析。

## 1.2 方法

1.2.1 显微结构观察 选取叶片中部,切成边长约5 mm的小块,采用石蜡切片法<sup>[8]</sup>制片,切片厚度10 μm,切片方向为横切;采用Leica-DMLB显微镜(德国Leica公司)观察并拍照。

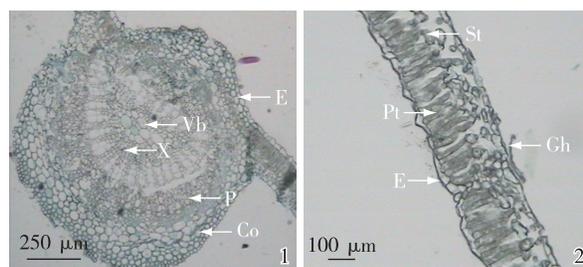
1.2.2 组织化学定位观察 采用冰冻切片法<sup>[9]</sup>将叶片主脉横切,切片厚度20 μm;参照徐国均等<sup>[10]</sup>的方法进行黄酮的组织化学定位,参照李雁群等<sup>[11]</sup>的方法进行三萜和多糖的组织化学定位,并制成临时装片,采用Leica-DMLB显微镜观察并拍照。

## 2 结果和分析

### 2.1 青钱柳叶片的显微结构

3个种源青钱柳叶片横切面的解剖结构一致,其中,来源于湖北五峰的青钱柳叶片横切面的解剖结构见图1。

由图1可以看出:从横切面上看,青钱柳叶片为异面叶,由表皮、叶肉和叶脉组成。表皮细胞方形或长方形,上、下表皮均由1层致密的表皮细胞组成,下表皮散生有气孔,表皮具腺毛。叶肉细胞分化为栅栏组织和海绵组织,栅栏组织由1层柱状细胞构成,排列紧密;海绵组织由形状不规则的细胞



E: 表皮 Epidermis; Vb: 维管束 Vascular bundle; X: 木质部 Xylem; P: 韧皮部 Phloem; Co: 厚角组织 Collenchyma; St: 海绵组织 Spongy tissue; Pt: 栅栏组织 Palisade tissue; Gh: 腺毛 Glandular hair.

1: 主脉 Main vein; 2: 侧脉 Lateral vein.

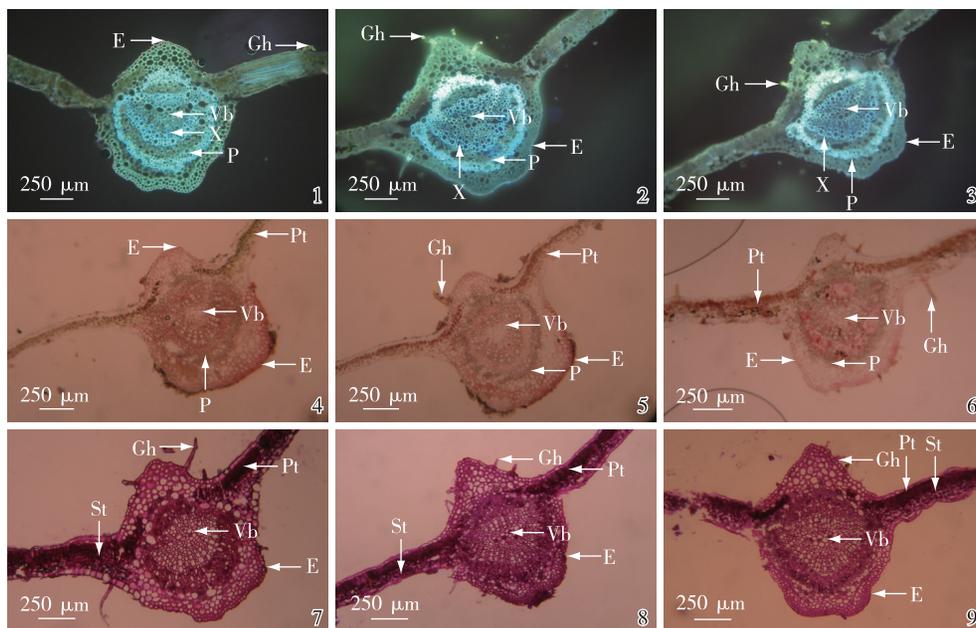
图1 来源于湖北五峰的青钱柳叶片横切面的解剖结构

Fig. 1 Anatomical structure of leaf transverse section of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja from Wufeng of Hubei

构成,排列疏松。主脉发达,其上、下表皮内有1或2层厚角组织,内层排列有形状不规则的薄壁组织细胞,包含半圆形的维管束1个,其中,木质部位于近轴面,韧皮部位于远轴面。

### 2.2 黄酮、三萜和多糖类成分的组织化学定位

不同种源青钱柳叶片中黄酮、三萜和多糖的组织化学定位观察结果见图2。



E: 表皮 Epidermis; Gh: 腺毛 Glandular hair; Vb: 维管束 Vascular bundle; X: 木质部 Xylem; P: 韧皮部 Phloem; Pt: 栅栏组织 Palisade tissue; St: 海绵组织 Spongy tissue.

1-3: 黄酮的组织化学定位 Histochemical localization of flavonoids; 4-6: 三萜的组织化学定位 Histochemical localization of triterpenoids; 7-9: 多糖的组织化学定位 Histochemical localization of polysaccharides. 1,4,7: 湖北五峰种源 Provenance from Wufeng of Hubei; 2,5,8: 湖南沅陵种源 Provenance from Yuanling of Hu'nan; 3,6,9: 四川沐川种源 Provenance from Muchuan of Sichuan.

图2 3个青钱柳种源叶片中黄酮、三萜和多糖的组织化学定位

Fig. 2 Histochemical localization of flavonoids, triterpenoids and polysaccharides in leaf of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja from three provenances

由图2可以看出:来源于湖北五峰、湖南沅陵和四川沐川的青钱柳叶片中黄酮、三萜和多糖在叶片组织的组织化学定位特征基本一致。从黄酮的组织化学定位看(图2-1~3),腺毛和表皮显黄绿色荧光,木质部和韧皮部显天蓝色荧光。从三萜的组织化学定位看(图2-4~6),腺毛、表皮、韧皮部和栅栏组织均显色,其中,栅栏组织显色最明显。从多糖的组织化学定位看(图2-7~9),叶片各组织均显紫红色,其中,栅栏组织显色最明显,韧皮部显色次之。

### 3 讨论和结论

叶片形态解剖结构是叶片生理功能的基础,能够反映植物对环境变化的响应与适应<sup>[12]</sup>。尚旭岚等<sup>[13]</sup>认为,在不同光照和施肥条件下青钱柳叶片呈现旱生叶和阴生叶特征;孙同兴等<sup>[14]</sup>和王玉等<sup>[15]</sup>的观察结果显示,在青钱柳叶片的主脉维管束组织中,在正常维管束的侧面或上方具有1个副维管束;而本研究在青钱柳叶片解剖结构中并没有观察到这一特征,其余结构则与他们的报道基本一致。造成这一差异的原因可能与青钱柳的株龄、基因型和生长条件以及显微观察的放大倍率有关,具体原因有待进一步研究。

组织化学定位观察结果表明:在青钱柳叶片中,黄酮主要分布于腺毛和表皮等外部组织中,可能与其防止微生物入侵、抗紫外辐射伤害有关<sup>[16]</sup>,但在木质部和韧皮部中大量积累,在栅栏组织和海绵组织中未有分布,其原因有待进一步研究。三萜主要位于青钱柳叶片的腺毛、表皮、韧皮部和栅栏组织中,而王玉<sup>[6]</sup>认为三萜化合物存在于青钱柳叶片的腺毛、表皮、皮层薄壁细胞、木质部、韧皮部和栅栏组织中,这种差异可能与青钱柳的生长环境和株龄有关。多糖在青钱柳叶片各组织均有分布,并在栅栏组织中含量最高。在青钱柳叶片中,三萜和多糖均在栅栏组织中大量积累,表明栅栏组织可能是三萜和多糖的重要合成场所。

综合分析结果表明:来源于湖北五峰、湖南沅陵和四川沐川的青钱柳叶片的解剖结构以及叶片中黄酮、三萜和多糖的组织化学定位特征基本一致。青钱柳叶片具有典型异面叶的特征,叶肉细胞分化为栅栏组织和海绵组织;青钱柳叶片中的黄酮在木质部和韧皮部中大量积累,而三萜和多糖均在栅栏组织中大量积累。但青钱柳叶片中黄酮、三萜和多糖的分布机制及这些活性成分与青钱柳生长和抗性生理的相关性则有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 杨万霞,方升佐.青钱柳种皮甲醇浸提液的生物测定[J].植物资源与环境学报,2005,14(4):11-14.
- [2] 李磊,谢明勇,易醒,等.青钱柳多糖组分及其降血糖活性研究[J].江西农业大学学报,2001,23(4):484-486.
- [3] 黄明圈,上官新晨,徐明生,等.青钱柳多糖降血脂作用的研究[J].江西农业大学学报,2011,33(1):157-161.
- [4] XIE J H, SHEN M Y, XIE M Y, et al. Ultrasonic-assisted extraction, antimicrobial and antioxidant activities of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89: 177-184.
- [5] DENG B, CAO Y N, FANG S Z, et al. Variation and stability of growth and leaf flavonoid content in *Cyclocarya paliurus* across environments [J]. Industrial Crops and Products, 2015, 76: 386-393.
- [6] 王玉.青钱柳三萜皂苷的组织化学和细胞化学定位[D].南京:南京林业大学林学院,2011:22-27.
- [7] DENG B, SHANG X L, FANG S Z, et al. Integrated effects of light intensity and fertilization on growth and flavonoid accumulation in *Cyclocarya paliurus*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60: 6286-6292.
- [8] 沈梅芬,刘慧芳,黄美俐.生物微观标本制作[M].上海:上海教育出版社,1982:11-23.
- [9] 谢佩松,徐中根,韦存虚.冰冻切片技术在植物显微结构和组织化学中的应用[J].生物学杂志,2009,26(3):72-74.
- [10] 徐国均,何宏贤,徐璐珊,等.中国药材学:上册[M].北京:中国医药科技出版社,1996:30-32.
- [11] 李雁群,杜金子,尹小红,等.石韦孢子叶片组织化学定位[J].基因组学与应用生物学,2009,28(2):345-348.
- [12] 李芳兰,包维楷.植物叶片形态解剖结构对环境变化的响应与适应[J].植物学通报,2005,22(增刊):118-127.
- [13] 尚旭岚,李琼琼,邓波,等.光照和施肥对青钱柳幼苗叶片性状与解剖结构的影响[J].西南林业大学学报,2014,34(6):9-15.
- [14] 孙同兴,徐丽丽.青钱柳叶的结构鉴定[J].中草药,2006,37(2):271-273.
- [15] 王玉,赵虎,洪香香.青钱柳营养器官的解剖结构及其生态适应性[J].东北林业大学学报,2011,39(10):40-44.
- [16] SCHMITZ-HOERNER R, WEISSENBOCK G. Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels[J]. Phytochemistry, 2003, 64: 243-255.

(责任编辑:郭严冬)