

古生物学报, 58(4):526—542(2019年12月)

Acta Palaeontologica Sinica, 58(4):526—542(December, 2019)

doi:10.19800/j.cnki.aps.2019.04.010

苏铁属植物叶表皮特征及其分类学和古生态学意义^{*}

梁水清^{1,2)} 苏涛¹⁾** 胡瑾瑾¹⁾ 李楠³⁾**

1)中国科学院西双版纳热带植物园热带森林生态学重点实验室, 勐腊 666303, sutao@xtbg.org.cn;

2)中国科学院大学, 北京 100049;

3)中国科学院深圳仙湖植物园, 深圳 518004, andreali1997@126.com

摘要 苏铁属(*Cycas*)作为一类古老的裸子植物, 经历了漫长的演化历史, 因此, 深入研究其形态特征与环境的相互关系, 有望为古环境重建提供重要参考依据。本文分析西双版纳和深圳两地植物园栽培环境下 27 种苏铁属植物的叶表皮特征及气孔参数的差异, 并进一步探讨气孔参数与系统发育的关系。结果表明: (1) 苏铁属内叶表皮特征保守稳定, 具有一定的分类学意义; 依据表皮细胞及气孔器特征划分了四种叶表皮类型, 可为苏铁现生植物或化石的鉴定提供参考。 (2) 四种叶表皮类型指示了不同的原生生境特征, 对古环境具有一定的指示意义。 (3) 同一环境下, 气孔参数在属内的种间差异显著, 其次, 气孔指数在属内变化与系统发育有关, 除气孔指数具显著的系统发育信号外, 其余气孔参数均无显著系统发育信号。本研究结果表明气孔参数法重建古大气 CO₂ 浓度时, 需尽可能利用亲缘关系相近、叶表皮和生境皆相似的代理种, 并明确气孔参数与大气 CO₂ 分压的相关关系在种间的异同, 从而提高该方法的有效性。

关键词 苏铁属 叶表皮特征 气孔参数 系统发育信号 古环境 古 CO₂ 浓度

1 前言

叶表皮特征受环境和遗传因素的综合影响, 稳定的叶表皮特征可为现生植物或叶片化石的分类鉴定提供重要参考依据(Stace, 1965, 1984)。此外, 叶表皮是植物与外界环境直接接触的重要部位, 在不同的环境中表现出不同的适应特征, 可反映环境对植物的影响(杨青松等, 2012; Krober *et al.*, 2015), 其次, 分布于叶表皮之上的气孔是植物与外界进行气体交换的重要通道, 包含着植物所处外界环境的气候信息(孙柏年等, 2009; McElwain and Chaloner, 1996)。因此, 叶片化石的角质层所反映的叶表皮及气孔特征常被作为古环境、古生态和古气候重建的代理指标(Wagner-Cremer *et al.*, 2010; Jordan *et al.*, 2014; Bush *et al.*, 2017; McElwain and Steinthorsdottir, 2017; Steinthorsdottir *et al.*, 2018), 如: 角质层厚度、气孔下陷、气孔隐窝、表皮乳

突及毛基特征等, 可用于指示古环境的干湿状况(Hill, 1998; Axsmith and Jacobs, 2005); 细胞垂周壁弯曲程度指示古植被郁闭度(Dunn *et al.*, 2015a, b); 依据气孔参数(气孔密度(Stomatal density, SD)与气孔指数(Stomatal index, SI))与大气 CO₂ 分压($p\text{CO}_2$)的相关性(Woodward, 1987; Woodward and Bazzaz, 1988; Royer, 2001), 可定量重建古大气 CO₂ 浓度。因此, 深入开展现生植物类群的叶表皮及气孔特征与环境间关系的研究, 可为叶片化石角质层特征推断古环境及古气候等研究提供对照与参考。

气孔参数法是目前国际上定量恢复古大气 CO₂ 浓度最为常用的方法之一, 其主要基于现生代理种(即化石种的现生最近亲缘种)的 SD/SI- $p\text{CO}_2$ 回归关系的经验方程, 分析化石种的气孔参数以估算化石点的古大气 CO₂ 浓度。近几十年来, 该方法已获取了来自不同地质时期古大气 CO₂ 浓度变化的信息(McElwain *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 1999; Royer *et al.*, 2001; Royer, 2003; Quan *et al.*, 2009;

收稿日期: 2019-10-12

^{*} 中国科学院前沿科学与教育局重点研究项目基金(No. QYZDB-SSW-SMC016)和中国科学院青年创新促进会项目基金(No. 2017439)联合资助。

^{**} 通讯作者: 苏涛, 从事古植物、古环境与古生态学研究; 李楠, 从事植物系统学、保护生物学、园林及城市林业等研究。

Bai *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015, 2018; Liu *et al.*, 2016), 如 Van der Burgh 等(1993)利用无梗花栎(*Quercus petraea*)的气孔指数重建了一千万年以来古大气 CO₂ 浓度变化;Retallack(2001)则结合了4个现代银杏亲缘属的气孔参数对3亿年来的古大气 CO₂ 浓度进行了重建;Hu 等(2015)和黄华生等(2016)利用帽斗栎(*Q. guyavifolia*)的气孔指数重建的云南晚上新世三个化石点的大气 CO₂ 浓度结果基本一致。利用植物气孔重建古大气 CO₂ 浓度的结果与其他代理指标结果基本吻合(Beerling and Royer, 2011), 这为认识地质时期大气 CO₂ 浓度变化历史提供了重要参考。

尽管该方法已被广泛使用,但其有效性仍有待于进一步检验:气孔参数对 CO₂ 浓度的响应具有种间特异性(Royer, 2001; Jordan, 2011),这会导致以不同亲缘类群的气孔参数作为代理,重建结果不尽相同。在 Royer(2001)综述的176种C3植物中,大部分植物的SD/SI-*p*CO₂关系呈负相关,极少部分呈正相关,但也有一部分植物对CO₂浓度变化无响应。即使同一属内的物种也存在着SD/SI-*p*CO₂关系的种间特异性,如松属(*Pinus*) (Penuelas, 1990; Stewart and Hoddinott, 1993)、澳柏属(*Callitris*) (Haworth *et al.*, 2010)、桦木属(*Betula*) (Eide and Brirks, 2006; Finsinger and Wagner-Cremer, 2009)和栎属(*Quercus*) (贺新强等, 1998)等。目前相关规律尚不清楚,如气孔参数或SD/SI-*p*CO₂关系在种间的变化是否与亲缘关系、表皮形态或生境有关等问题亟待深入探讨。其次,前人研究的材料多为单一或少数物种,对属一级水平下较多物种的气孔参数或SD/SI-*p*CO₂响应关系进行全面系统的探究较少。因此,探讨较多物种的气孔参数或SD/SI-*p*CO₂关系在属内的变化规律对进一步认识气孔参数法的有效性具有重要意义。

苏铁类植物是现存最古老的种子植物类群之一,其形态分化、地理分布及生物多样性等在中生代达到鼎盛时期,之后随着被子植物在新生代的兴盛而逐渐衰弱,目前仅剩部分孑遗类群(杨永等, 2017; Magallon *et al.*, 2013)。现存苏铁类植物共2科10属,即苏铁科(Cycadaceae)苏铁属(*Cycas*)和泽米铁科(Zamiaceae)下的9属(Calonje *et al.*, 2013–2019)。苏铁属是一个起源早(距今约170–230 Ma)(Nagalingum *et al.*, 2011)、分布广且种类繁多的类群,属下共117种,主要分布在亚洲东部以及东南部、大洋洲及周围岛屿、非洲东部及马达加斯加的

热带亚热带地区(杨永等, 2017; Calonje *et al.*, 2013–2019;)。虽然近期的分子系统学研究表明,现存苏铁植物是近期(11.6–5.3 Ma)才辐射演化出来的(Nagalingum *et al.*, 2011),但其在宏观、微观形态上仍保留着祖先类群的古老性(Hill, 2004; Griffith *et al.*, 2014)。苏铁类化石自二叠纪晚期到新生代在世界各地广泛分布(Hollick, 1932; Krassilov, 1978; Yokoyama, 1979; Su *et al.*, 2014; Erdei *et al.*, 2018)。苏铁类植物由于历经过漫长的地史时期,演化缓慢,且具有较为丰富的化石记录,因此,其极有可能是一类认识气孔特征与古大气 CO₂ 浓度相互关系的重要类群。

苏铁植物的叶表皮分析最初是应用在其叶片化石的鉴定上(Worsdell, 1898; Thomas and Bancroft, 1913; Pant and Nautiyal, 1963),随后被广泛应用于解决该类现生植物的分类或系统演化等方面的问题,如众多前人研究表明:苏铁属植物叶表皮性状在属下属间保守,有一系列共源性性状,在属或种间具有一定的分类学意义(王玉忠、陈家瑞, 1995; 陈谭清等, 1996; Pant and Nautiyal, 1963; Greguss, 1968; Hill and Stanberg, 1999; Mickle *et al.*, 2011; Griffith *et al.*, 2014)。但结合苏铁类植物的叶表皮特征探讨其气孔与大气 CO₂ 浓度关系方面的研究较少:来自中侏罗世的蓖羽叶苏铁化石(*Ctenis*)的气孔参数较其对应现生种低,据此推测中生代大气 CO₂ 浓度高于当前水平(McElwain *et al.*, 1998),而后 McElwain 等(1999)假定其气孔参数与*p*CO₂具有负相关关系,并将其应用到气孔比率法中,重建了三叠纪-侏罗纪过渡时期的大气 CO₂ 浓度;然而,分别来自不同属的6种现生苏铁植物的气孔参数在短期人工控制实验下却对 CO₂ 浓度变化无响应(Haworth *et al.*, 2011)。

综上所述,气孔参数法能否基于属一级水平,选择任一现生代理种进行古大气 CO₂ 浓度重建? 属内亲缘关系相近、叶表皮与生境皆相似的物种是否共享相似的气孔参数或SD/SI-*p*CO₂关系等问题亟待解决。

本文旨在通过分析同一栽培环境下,苏铁属内不同物种间的叶表皮特征及气孔参数差异,并综合分析气孔参数与叶表皮类型、原生生境及系统发育间的关系,且以该类植物为例,进一步探讨上述科学问题,从而为深入探讨气孔参数法在重建古大气 CO₂ 浓度中的有效性提供参考。

2 材料与方法

2.1 采样点

样品分别采自西双版纳热带植物园苏铁园(XTBG, 21°55'N, 101°16'E, 海拔 570 m)和深圳仙湖植物园国际苏铁种质资源保护中心(FBG, 22°34'N, 114°10'E, 海拔 60—180 m)两地。XTBG 位于云南省南部, 地处热带北缘, 属北热带季风气候。该地年均温 21.8 °C; 年均降雨量 1 513 mm, 受西南季风气候主导, 降雨分配不均, 存在明显的旱季(11 月—次年 4 月)和雨季(5 月—10 月)之分, 而 80%—85% 的降雨发生在雨季; 年均相对湿度 82.7% (1981—2010, 云南省气象局勐腊县气象站)。XTBG 的苏铁园区为平地, 土壤基质为砂质壤, 园区主要种植苏铁类植物, 无高大乔木或灌丛生长其中而造成明显的林下遮阴环境。FBG 位于北回归线以南, 属南亚热带季风气候。该地年均温 23.0 °C; 年均降雨量 1 944 mm, 全年 86% 的降雨量出现在 4—9 月份; 年均相对湿度 74.9% (1981—2005, 广东省深圳市气象局)。FBG 的苏铁植物主要栽种于国际苏铁种质资源保护中心, 其土壤类型为黄壤, 坡向朝西北, 海拔跨度约 120 m, 对根植于此的苏铁类植物是一个光照充足, 排水性良好的栽培生境。

XTBG 和 FBG 采样点虽均为栽培环境, 但由于苏铁类植物具有耐旱耐贫瘠特性, 两植物园在浇水、施肥及除草等人为管理上均干预较少, 主要以自然生长为主。每年不定期对具有蚧壳虫病害的植株进行除害防治, 在秋冬时期对枯枝老叶进行一轮修剪, 以保持植株的干燥通风环境。因此, 同一采样点, 各苏铁类植物的栽培环境与人为管理是一致的。材料采自同质环境, 是为了最大限度地减小由气候环境异质性所造成的属内物种间气孔参数的差异, 从而更好地反映系统发育关系对物种间气孔参数差异的影响。

2.2 研究材料与采集

本文共采集到苏铁属植物 27 种, 包括在世界苏铁名录(Calonje *et al.*, 2013–2019)中分类地位得到承认的 24 种和 3 个异名种, 其中 XTBG 采集 15 种, FBG 采集 25 种, 两地共有种为 13 种(表 I)。27 种苏铁植物的野外原生生境存在一定的差异, 主要体现在光照和水分条件上, 主要包括以下四种类型: (1) 植被开阔、干旱贫瘠的石灰岩生境; (2) 中生

环境, 开阔干旱的石灰岩灌丛至荫蔽湿润的林下或灌丛生境; (3) 较为遮阴湿润的热带及亚热带雨林或阔叶林下生境; (4) 近海岸地区, 其母岩多为珊瑚礁形成的钙质沙土, 热量充足、雨量充沛的雨林或灌丛环境(表 I)。

采样时, 每物种均选择 3 个健康成熟植株, 于植株朝南向阳处, 每植株分别采集 3 片羽叶中部的 1 枚羽片(即每物种共 9 样品)。实验所采集的材料均为新鲜叶片, 从野外采集回来, 适应用 FAA 固定液(90 ml 的 50% 酒精+5 ml 冰醋酸+5 ml 的 38% 福尔马林溶液)进行暂时保存。

2.3 叶表皮实验

样品经过 30% 的酒精溶液进行表面清理后, 在叶片中部位置剪取约 $0.5 \times 1 \text{ cm}^2$ 的一小块材料用于叶表皮实验。实验方法参照 Stace(1965), 将剪取好的样品材料浸入冰醋酸与 30% 双氧水等比例混合溶液中, 在 60—80 °C 下水浴加热 4—6 小时直至叶片呈无色透明, 于清水中多次清洗后, 用解剖针将上下表皮分离, 接着换用软毛刷将附着于表皮上的叶肉组织清除干净, 再用 1% 的番红水溶液染色 10 分钟左右后用 50% 酒精脱色, 最后, 将样品置于载玻片上, 滴上甘油进行封片。所有玻片存放于中国科学院西双版纳热带植物园古生态研究组。

2.4 叶表皮特征的观察与气孔性状参数的计算

制片置于连接着照相机(徕卡 DMC4500)和电脑成像系统的光学显微镜(徕卡 DM1000)在 20 倍物镜下观察叶表皮形态特征, 描述术语参照 Pant 和 Nautiyal(1963)及 Rudall 等(2013)并避开叶脉区域选取面积为 $622 \times 467 \mu\text{m}^2$ (约 0.290 mm^2) 的视野进行拍照保存, 用于气孔参数的计数。气孔参数的计算参照 Poole 和 Kürschner(1999): 气孔密度为单位叶面积(mm^2)气孔个数; 气孔指数为气孔占气孔与表皮细胞总数的百分比 $SI = SD / (SD + ED) \times 100\%$, ED(Epidermal density)为单位面积的表皮细胞个数。每样品选取 3 个视野拍照, 因此, 每物种的气孔密度和指数分别进行了 27 次计数(3 个体 $\times$ 3 羽片 $\times$ 3 视野 = 27), 其余四个气孔性状参数: 气孔口长度(SPL: stomatal pore length)、气孔口宽度(SPW: stomatal pore width)、孔口长宽比(R: Ratio of stomatal pore length and width)和气孔口面积(SPA: stomatal pore area)则每物种分别随机进行

表 I 本研究所采集的苏铁属植物物种信息表
The collection information of *Cycas* for epidermal analysis in this study

序号 No.	物种 Species	原产地 Original place	原生境类型 Native habitat
XTBG			
1	<i>Cycas balansae</i> Warb.	越南	CM
2	<i>C. changjiangensis</i> N. Liu(异名种)	中国	M
3	* <i>C. diannanensis</i> Z. T. Guan & G. D. Tao	中国	CM
4	* <i>C. fairylakea</i> D. Yue Wang	中国, 广东	CM
5	* <i>C. guizhouensis</i> K. M. Lan & R. F. Zou	中国	M
6	* <i>C. hainanensis</i> C. J. Chen	中国	CM
7	* <i>C. hongheensis</i> S. Y. Yang & S. L. Yang	中国, 西双版纳	OD
8	* <i>C. micholitzii</i> Dyer	越南	CM
9	* <i>C. panzihuaensis</i> L. Zhou & S. Y. Yang	中国	OD
10	* <i>C. parvula</i> S. L. Yang(异名种)	中国, 云南	CM
11	* <i>C. pectinata</i> Buch-Ham.	中国	CM
12	* <i>C. segmentifida</i> D. Yue Wang & C. Y. Deng	中国	CM
13	* <i>C. sexseminifera</i> F. N. Wei	越南	OD
14	* <i>C. siamensis</i> Miq.	柬埔寨	OD
15	* <i>C. szechuanensis</i> Cheng et L. K. Hu	中国	CM
FBG			
1	<i>C. debaoensis</i> Y. C. Zhong & C. J. Chen	中国, 广西	M
2	* <i>C. diannanensis</i> Z. T. Guan & G. D. Tao	中国	CM
3	<i>C. elongata</i> (Leandri) D. Yue Wang	越南	M
4	* <i>C. fairylakea</i> D. Yue Wang	中国, 广东	CM
5	<i>C. ferruginea</i> F. N. Wei	中国, 广西	OD
6	* <i>C. guizhouensis</i> K. M. Lan & R. F. Zou	中国	M
7	* <i>C. hainanensis</i> C. J. Chen	中国	CM
8	* <i>C. hongheensis</i> S. Y. Yang & S. L. Yang	中国, 西双版纳	OD
9	* <i>C. media</i> R. Br.	澳大利亚	NC
10	* <i>C. micholitzii</i> Dyer	越南	CM
11	<i>C. multipinnata</i> C. J. Chen & S. Y. Yang	越南	CM
12	* <i>C. panzihuaensis</i> L. Zhou & S. Y. Yang	中国	OD
13	* <i>C. parvula</i> S. L. Yang(异名种)	中国, 云南	CM
14	* <i>C. pectinata</i> Buch-Ham.	中国	CM
15	<i>C. revoluta</i> Thunb.	中国	OD
16	<i>C. rumphii</i> Miq.	印度尼西亚	NC
17	<i>C. seemannii</i> A. Braun	印度尼西亚	NC
18	* <i>C. segmentifida</i> D. Yue Wang & C. Y. Deng	中国	CM
17	<i>C. seemannii</i> A. Braun	印度尼西亚	NC
18	* <i>C. segmentifida</i> D. Yue Wang & C. Y. Deng	中国	CM
19	* <i>C. sexseminifera</i> F. N. Wei	越南	OD
20	<i>C. shiwandashanica</i> Hung T. Chang & Y. C. Zhong(异名种)	中国, 广西	CM
21	* <i>C. siamensis</i> Miq.	柬埔寨	OD
22	<i>C. simplicipinna</i> (Smitinand) K. D. Hill	中国, 云南	CM
23	* <i>C. szechuanensis</i> Cheng et L. K. Hu	中国	CM
24	<i>C. taitungensis</i> C. F. Shen, K. D. Hill, C. H. Tsou & C. J. Chen	中国, 台湾	OD
25	<i>C. thouarsii</i> R. Br. ex Gaudich.	科摩罗岛	NC

植物命名参照 The Word List of Cycads(Calonje *et al.*, 2013-2019), 原生境信息来源: 中国植物志(<http://www.efloras.org/>)、PlantNet (The Plant Information Network System of the Botanic Gardens Trust, <http://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/>)及 Hill(2008)的研究结果。OD (Open and dry habitat)代表的是开阔干旱的原生境; CM(Closed and moist habitat)代表的是荫蔽湿润的原生境; M(Mesophytic habitat)代表中生境; NC(Near-coastal)代表的是近海岸地区的温暖湿润生境。左上角标星号*的物种表示两地共有。

The plant names according to The Word List of Cycads (Calonje *et al.*, 2013-2019) and the native habitat information comes from The Flora of China (<http://www.efloras.org/>), PlantNet (The Plant Information Network System of the Botanic Gardens Trust, <http://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/>) and Hill (2008). OD stands for the open-dry habitat; CM stands for the closed-moist habitat; M stands for Mesophytic of which habitat is both open-dry and closed-moist; NC represents a warm and humid habitat that located in the coastal areas. Species marked with * represents it common to both study sites.

了 36 个气孔的计数,最后计算均值与标准误,所有参数测量均通过 ImageJ 1.42q (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) 完成。本实验选取的 27 种苏铁属植物均为气孔下生型,所以只对下表皮进行了气孔性状参数计算。

2.5 系统发育信号检测

本文利用 Blomberg's K 值法 (Blomberg *et al.*, 2003) 对苏铁属植物的气孔参数及气孔性状参数受种间亲缘关系的影响程度及其显著性进行量度。当 $K=1$ 时,表明性状随系统发育树的分布符合布朗运动模型; K 值越接近 1 或大于 1,表明系统发育信号越强,即性状演化较为保守,近缘物种其性状越相似 (Blomberg *et al.*, 2003)。检测过程所需的苏铁属系统发育树参照 Liu 等 (2018) 近期联合了核基因片段和叶绿体基因序列分析所得的贝叶斯树。

2.6 数据统计

气孔参数及气孔性状参数在两地、不同物种间或表皮类型间的比较采用单因素方差分析 (One way ANOVA), 并对差异显著的因变量采用 Scheffé 法进行多重比较。单因素方差分析在 SPSS 20.0 (IBM SPSS Inc. USA) 中进行, 并使用 Sigmaplot 12.5 绘图。系统发育信号检测的 K 值及其显著性检验采用 R version 3.5.0 软件 Phy-

1. 近轴面叶表皮细胞排列无规则, 为近等轴的多边形 (细胞长宽比 <2.0 倍), 垂周壁平直; 气孔副卫细胞较多 (10—16 个), 有近似气孔簇现象。
2. 远轴面的表皮细胞形态与近轴面相似; 气孔器的保卫细胞和副卫细胞均下陷低于叶表皮层, 形成气孔口较小的窝穴 类型 1
2. 远轴面表皮细胞较近轴面细胞稍有延长趋势, 垂周壁稍有波状弯曲; 气孔器仅保卫细胞下陷低于叶表皮, 气孔窝穴不明显 类型 2
1. 近轴面常多个表皮细胞呈平行排列, 近、远轴两面叶表皮细胞具有延长趋势 (细胞长宽比 2.0—3.0 倍), 垂周壁稍有波状弯曲或波状明显; 气孔器副卫细胞个数较少, 约 5—10 个。
3. 表皮细胞接近多边形但稍有延长趋势, 垂周壁稍有波状弯曲; 气孔副卫细胞个数 6—10 个左右, 毛基数量较多, 气孔下陷较深, 有近似气孔簇现象 类型 3
3. 近、远轴面叶表皮细胞为长方形 (细胞长宽比 3.7—8.7 倍), 延长趋势十分明显, 垂周壁波状弯曲; 气孔副卫细胞个数最少, 为 5—8 个左右, 气孔下陷较浅, 无近似气孔簇现象 类型 4

3.2 气孔参数及气孔性状参数在属内的变化

相似栽培生境下, 27 种苏铁属植物不仅在叶表皮形态特征上有所差异, 并且气孔参数及气孔性状参数也表现出了一定的差异 (表 III, 各物种的参数详情见表 IV)。单因素方差分析结果显示 (表 III): 两地相同的 13 个物种的气孔参数 (SD、SI) 及气孔性状参数 (SPL、SPW、R 和 SPA) 均无显著差异; 同一

tools 程序包的 “*phylosig()*” 函数进行计算 (Revell, 2012)。

3 结 果

3.1 叶表皮形态特征

两采样点相同物种的叶表皮形态特征观察结果一致。与前人观察结果相似, 苏铁属植物的叶表皮特征在属内较为保守, 具有一系列的叶表皮同源性状: 表皮细胞外平周壁上具有明显的单纹孔, 气孔下生型, 气孔下陷且分布无规律, 气孔器的保卫细胞两极呈 “T” 型加厚, 通常由 5—14 个近四边形的副卫细胞形成单列 “细胞环” 围绕在肾形保卫细胞边上, 气孔器排列形式为环列型 (Stephanocytic) (王玉忠、陈家瑞, 1995; 陈谭清等, 1996; 黄玉源, 2001; Pant and Nautiyal, 1963; Griffith *et al.*, 2014) (插图 1)。而不同的是, 本文发现部分物种具有近似气孔簇特征 (插图 1), 气孔簇是由两至多个紧密相连的气孔器组成的单元, 其内部气孔器仅被副卫细胞分离而无其他表皮细胞 (Tang *et al.*, 2002)。除上述特征外, 种间在其他特征尚存在一些差异 (详情见表 II), 而本文依据叶表皮细胞形状、长宽及长宽比、垂周壁式样、副卫细胞个数、气孔下陷程度等特征在种间的差异, 将 27 种苏铁属植物的叶表皮大致划分为以下四种类型 (插图 1, 详情见表 II):

栽培生境下, 物种间的气孔参数及气孔性状参数存在差异, 进行 Scheffé post hoc 多重比较 (由于该统计结果繁多, 未在文中一一列出) 的结果表明, 大部分物种之间的气孔参数及气孔性状参数均存在显著差异, 但也有少部分物种间差异不显著, 而仅从该结果来看, 暂未能发现一些明确的规律。

若物种按照叶表皮类型划分且不考虑类型内物

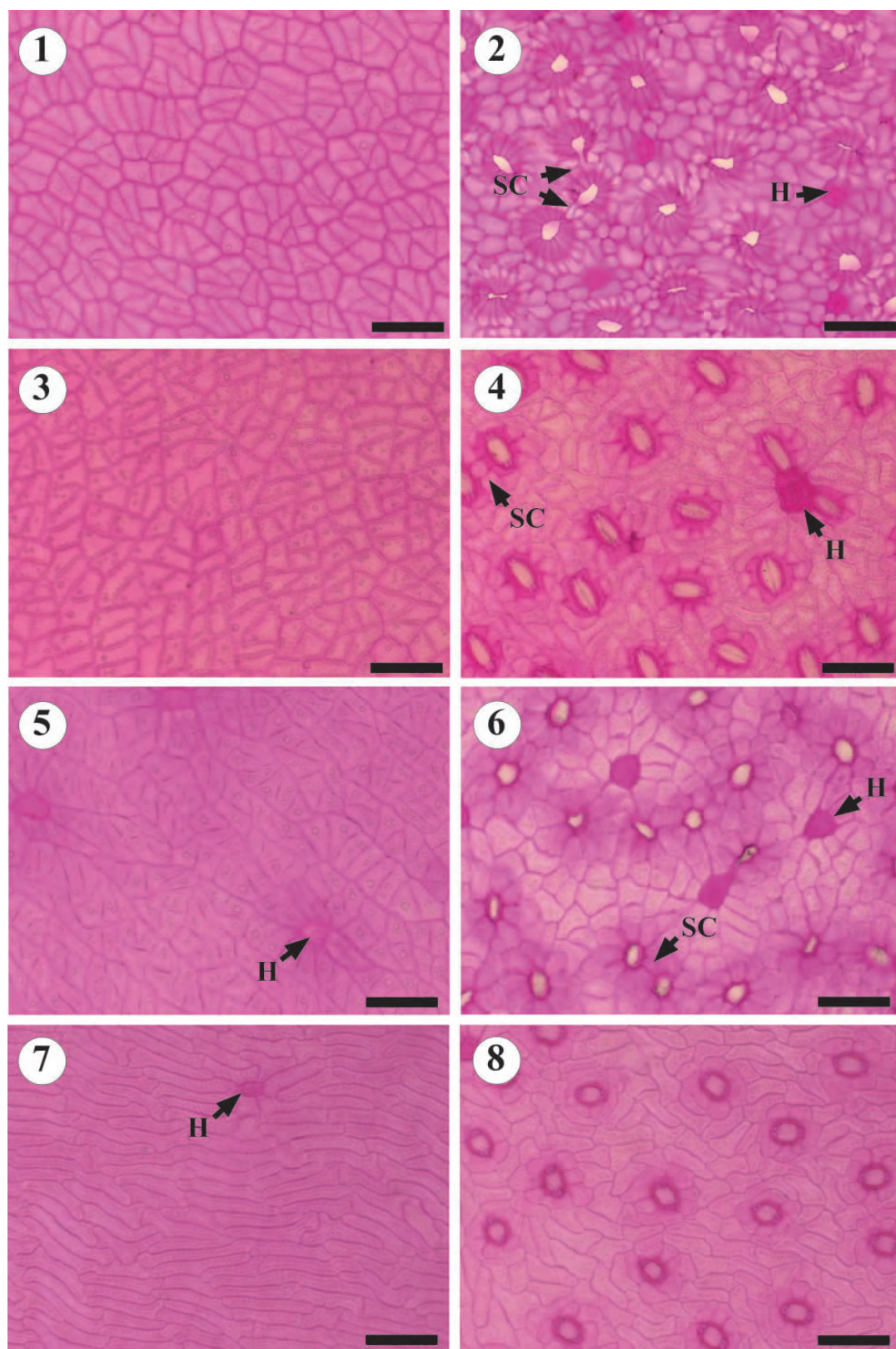


插图1 光学显微镜下苏铁属四种叶表皮形态类型代表物种的近、远轴面

Four epidermis types of *Cycas* species from both adaxial and abaxial surface views

SC 近似气孔簇, H 毛基。①③⑤⑦近轴面, ②④⑥⑧远轴面; ①②苏铁(*C. revoluta*)代表叶表皮类型1; ③④女王苏铁(*C. rumpii*)代表叶表皮类型2; ⑤⑥红河苏铁(*C. hongheensis*)代表叶表皮类型3; ⑦⑧叉叶苏铁(*C. micholitzii*)代表叶表皮类型4。比例尺=100 μm。

SC indicates stomatal cluster; H indicates hair base cells. ①③⑤⑦ Adaxial surface view; ②④⑥⑧ Abaxial surface view; ①② *C. revolute* (epidermal type 1); ③④ *C. rumpii* (epidermal type 2); ⑤⑥ *C. hongheensis* (epidermal type 3); ⑦⑧ *C. micholitzii* (epidermal type 4). Scale bars=100 μm.

表 II 光学显微镜下观察的 27 种苏铁属植物叶表皮近、远轴面及气孔形态特征
Leaf epidermal feature of 27 *Cycas* species under microscope in this study

物种 Species	近轴面 Adaxial			远轴面 Abaxial								表皮类型 E-Type	
	毛被密度	细胞形状	细胞长×宽 (μm^2)	细胞垂周壁	毛被密度	细胞形状	细胞长×宽 (μm^2)	细胞垂周壁	气孔下陷	气孔簇	副卫细胞数		
											Sub-cell		
攀枝花苏铁 <i>C. panzhihuaensis</i>	DH	EP	EP-L×W (μm^2)	Anti-wall	DH	EP	EP-L×W (μm^2)	Anti-wall	SS	SC	Sub-cell		
苏铁 <i>C. revoluta</i>	稀疏 Spa	多边形 Pol	50.00×33.19	垂直 Str	密集 Den	多边形 Pol	39.31×26.67	垂直 Str	深陷 H-S	+	10-15		
	稀疏 Spa	多边形 Pol	39.01×25.85	垂直 Str	密集 Den	多边形 Pol	31.07×22.56	垂直 Str	深陷 H-S	+	10-15		
台东苏铁 <i>C. taitungensis</i>	稀疏 Spa	多边形 Pol	42.63×25.11	垂直 Str	密集 Den	多边形 Pol	33.48×22.19	垂直 Str	深陷 H-S	+	10-15		
奥苏铁 <i>C. media</i>	稀疏 Spa	多边形 Pol	49.61×23.36	垂直 Str	密集 Den	近多边形 Pol-EI	42.91×21.69	稍起伏 S-Und	稍下陷 S	+	6-10		
女王苏铁 <i>C. rumphii</i>	极少 Rare	多边形 Pol	57.32×24.77	垂直 Str	密集 Den	近多边形 Pol-EI	42.50×22.03	稍起伏 S-Und	稍下陷 S	+	10-12		
斯曼苏铁 <i>C. seemanii</i>	—	多边形 Pol	34.96×22.54	垂直 Str	稀疏 Spa	近多边形 Pol-EI	37.33×19.84	稍起伏 S-Und	稍下陷 S	+	8-10		
光果苏铁 <i>C. thouarsii</i>	—	多边形 Pol	40.83×24.34	垂直 Str	稀疏 Spa	延长细胞型 EI	54.05×24.35	波状起伏 Und	稍下陷 S	+	8-10		
锈毛苏铁 <i>C. ferruginea</i>	稀疏 Spa	近多边形 Pol-EI	61.52×26.65	波状弯曲 Und	稀疏 Spa	近多边形 Pol-EI	57.56×21.91	稍起伏 S-Und	较下陷 M-S	+	6-10		
红河苏铁 <i>C. hongheensis</i>	稀疏 Spa	近多边形 Pol-EI	60.90×21.91	稍弯曲 S-Und	密集 Den	近多边形 Pol-EI	45.96×25.25	稍起伏 S-Und	较下陷 M-S	+	6-10		
暹罗苏铁 <i>C. siamensis</i>	密集 Den	近多边形 Pol-EI	75.99×25.09	稍弯曲 S-Und	密集 Den	延长细胞型 EI	54.88×24.96	波状起伏 Und	较下陷 M-S	+	6-8		
宽叶苏铁 <i>C. balansae</i>	—	延长细胞型 EI	95.22×18.26	波状弯曲 Und	稀疏 Rare	延长细胞型 EI	72.59×19.79	波状起伏 Und	稍下陷 S	—	5-8		
葫芦苏铁 <i>C. changjiangensis</i>	—	延长细胞型 EI	79.59×19.37	波状弯曲 Und	—	延长细胞型 EI	77.67×22.54	波状起伏 Und	稍下陷 S	—	6-8		
德保苏铁 <i>C. debaensis</i>	—	延长细胞型 EI	100.11×17.98	波状弯曲 Und	稀疏 Rare	延长细胞型 EI	70.97×19.05	波状起伏 Und	稍下陷 S	—	5-8		
滇南苏铁 <i>C. diamanensis</i>	—	延长细胞型 EI	86.76×19.22	波状弯曲 Und	稀疏 Rare	延长细胞型 EI	73.23×20.67	波状起伏 Und	稍下陷 S	—	6-8		
越南篦齿苏铁 <i>C. elongata</i>	稀疏 Spa	延长细胞型 EI	74.04×14.99	波状弯曲 Und	密集 Den	延长细胞型 EI	50.48×22.19	波状起伏 Und	稍下陷 S	—	5-8		
仙湖苏铁 <i>C. fairylakea</i>	极少 Rare	延长细胞型 EI	100.64×17.28	波状弯曲 Und	稀疏 Spa	延长细胞型 EI	76.29×19.64	波状起伏 Und	稍下陷 S	—	5-8		

续表 II
Continue II

物种 Species	近轴面 Adaxial			远轴面 Abaxial								
	毛被密度	细胞形状	细胞长×宽 (μm^2)	细胞垂周壁	毛被密度	细胞形状	细胞长×宽 (μm^2)	细胞垂周壁	气孔下陷	气孔簇	副卫细胞数	表皮类型 E-Type
	DH	EP	EP-L×W (μm^2)	Anti-wall	DH	EP	EP-L×W (μm)	Anti-wall	SS	SC	Sub-cell	
贵州苏铁 <i>C. guizhouensis</i>	—	延长细胞型 El	86.68×18.34	波状弯曲 Und	稀疏 Spa	延长细胞型 El	88.35×22.35	波状起伏 Und	稍下陷 S	—	6—8	4
篦齿苏铁 <i>C. pectinata</i>	极少 Rare	延长细胞型 El	70.82×18.76	波状弯曲 Und	密集 Den	延长细胞型 El	58.54×23.29	波状起伏 Und	稍下陷 S	—	6—8	4
海南苏铁 <i>C. hainanensis</i>	—	延长细胞型 El	77.98×18.82	波状弯曲 Und	—	延长细胞型 El	68.00×20.30	波状起伏 Und	稍下陷 S	—	6—8	4
叉叶苏铁 <i>C. micholitzii</i>	极少 Rare	延长细胞型 El	104.58×18.41	波状弯曲 Und	稀疏 Rare	延长细胞型 El	81.32×19.40	波状起伏 Und	稍下陷 S	—	6—8	4
多歧苏铁 <i>C. multipinnata</i>	—	延长细胞型 El	96.21×18.87	波状弯曲 Und	—	延长细胞型 El	61.29×18.85	波状起伏 Und	稍下陷 S	—	6—8	4
元江苏铁 <i>C. parvula</i>	—	延长细胞型 El	80.66×17.00	波状弯曲 Und	稀疏 Rare	延长细胞型 El	64.75×20.49	波状起伏 Und	稍下陷 S	—	6—8	4
叉孢苏铁 <i>C. segmentifida</i>	—	长条形 Lin	140.57×16.15	波状弯曲 Und	—	延长细胞型 El	94.80×18.18	波状起伏 Und	稍下陷 S	—	6—8	4
石山苏铁 <i>C. seerseniifera</i>	—	延长细胞型 El	78.34×20.93	波状弯曲 Und	稀疏 Rare	延长细胞型 El	58.17×22.23	波状起伏 Und	稍下陷 S	—	6—8	4
十万大山苏铁 <i>C. shiwandashanica</i>	—	长条形 Lin	116.21×17.50	波状弯曲 Und	—	延长细胞型 El	73.09×20.86	波状起伏 Und	稍下陷 S	—	6—8	4
单羽苏铁 <i>C. simplicipinna</i>	—	长条形 Lin	122.15×22.26	波状弯曲 Und	—	延长细胞型 El	78.56×21.90	波状起伏 Und	稍下陷 S	—	6—8	4
四川苏铁 <i>C. szechuanensis</i>	—	延长细胞型 El	97.22×18.93	波状弯曲 Und	稀疏 Rare	延长细胞型 El	76.22×21.68	波状起伏 Und	稍下陷 S	—	6—8	4

其中“—”代表无相应性状;“+”代表相应性状存在。

“—” means absent, “+” means present. DH: Density of the hair base, Spa: sparse, Den: dense; EP: epidermal cell's shape, EP L×W: epidermal cell's length and width, Pol: polygonal cell shape, El: elongated and extended cell shape, Pol-El: Polygonal but somewhat elongated, Lin: prolonged to linear cell shape, Anti-wall: anticlinal wall shape of the epidermal cell, Str: straight, Und: undulate, S-Und: somewhat undulate, SS: sunken stomata, H-S: highly sunken, SC: moderate sunken, Sub-cell: the number of subsidiary cells of each stomata apparatus, E-type: epidermal type.

种的差异,可探讨气孔参数与叶表皮类型的相关性。在 FBG 采样点,不同叶表皮类型物种的气孔参数及气孔性状参数的方差分析结果显示: SPL, SPW, SPA 及 R 在四种表皮类型物种间均无显著差异($p > 0.05$, one way ANOVA);但 SD 与 SI 在四种表皮类型物种间存在一定的差异(SD: $p = 0.004$, $F =$

6.11; SI: $p = 0.001$, $F = 7.58$, one way ANOVA),多重比较(Scheffé 法)结果显示:表皮类型 1 的 SD 显著高于表皮类型 4,其余各组无差异;表皮类型 3 的 SI 显著高于具有相似 SI 水平的 1、2 与 4 类型(插图 2)。由于 XTBG 采集的样品几乎都为表皮类型 4 的物种,所以未对其进行方差分析。

表Ⅲ 气孔参数在两地、不同物种间或表皮类型间的方差分析结果(F 值及其显著性)

F values resulting from one-way ANOVA on stomatal parameters

		DF	SD	SI	SPL	SPW	SPA	R
地点 Site (XTBG & FBG)		1	1.85	0.10	1.11	0.55	0.06	0.17
物种 Species	XTBG (15 species)	14	17.48 ***	37.26 ***	15.94 ***	36.25 ***	26.48 ***	23.29 ***
	FBG (25 species)	24	42.43 ***	41.30 ***	49.46 ***	3.62 ***	20.10 ***	26.89 ***
表皮类型 Epidermal type (FBG)		3	6.11 **	7.58 **	1.52	1.47	1.12	2.12

显著性水平:无*表示不显著,* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$;DF 为方差分析中的自由度。SD 为气孔密度,SI 为气孔指数,SPL 为气孔口长度,SPW 为气孔口宽度,SPA 为气孔口面积,R 为气孔口长度和宽度比。

If * absent means not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; DF is the freedom in ANOVA analysis. SD (stomatal density), SI (stomatal index), SPL (stomatal pore length), SPW (stomatal pore width), SPA (stomatal pore area), R (the ratio of stomatal pore length and width).

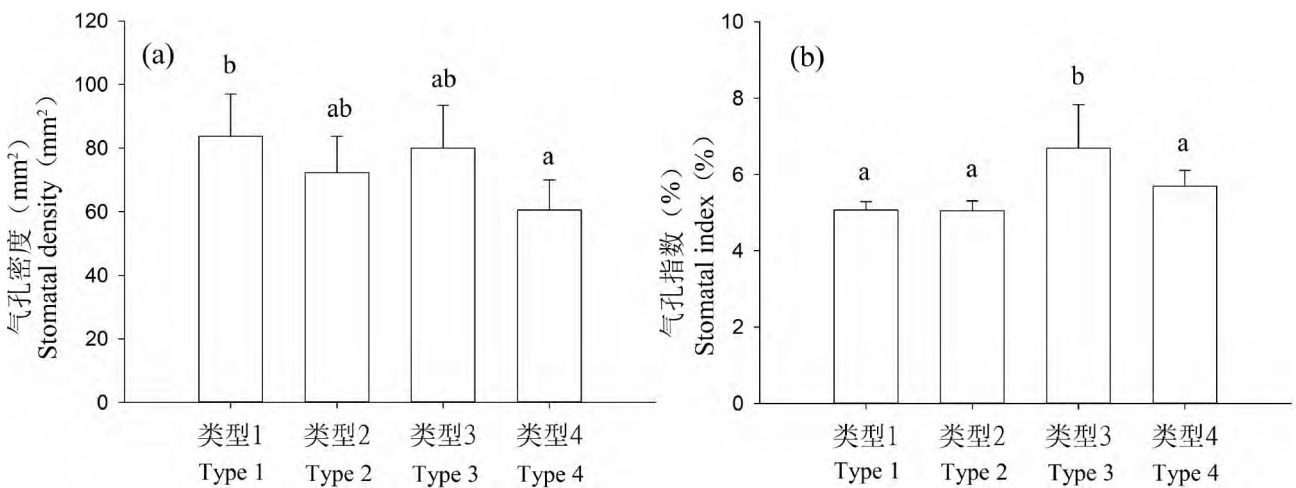


插图 2 不同表皮类型物种间气孔密度(SD)与气孔指数(SI)的比较

Comparisons of stomatal density (SD) and stomatal index (SI) among four epidermal type species

数值代表均值±标准差,不同字母表示多重比较(Scheffé 法)结果在 $p < 0.05$ 水平差异显著。

Values represent mean ± standard deviation, different letters indicate the results of multiple comparisons (Scheffé method) are significantly different at $p < 0.05$ level.

3.3 气孔参数及气孔性状参数的系统发育信号

FBG 采样点的 25 种苏铁属植物的气孔参数及气孔性状参数的系统发育信号检测结果显示(表 V): SD、SPL、SPW、SPA 及 R 的系统发育信号较弱,而 SI 的系统发育信号显著($K = 0.91$, $p = 0.03$),表明苏铁属植物的气孔指数(SI)相较于其他参数受到了较强的系统发育影响,具有系统发育保守性,即亲缘关系越相近的物种其 SI 更相似。由于 Bloomberg's K 值法对物种数的要求为 $N > 20$ (Blomberg *et al.*, 2003),所以本文未对 XTBG 的样品($N = 15$)进行系统发育信号检测。

4 讨 论

4.1 叶表皮特征的分类学意义

叶表皮特征在苏铁属内较为保守,一系列的共源性状表明该类群是一个自然的单系类群;其次,苏铁属植物叶表皮特征的相对稳定,不会因数十年的栽培环境而发生改变,表明其具有一定的分类学意义。前人曾对苏铁属植物的叶表皮开展过不少研究,主要探讨其在分类学或系统学上的意义,如王玉忠和陈家瑞(1995)发现属内气孔特征稳定,依据气孔器特征(副卫细胞大小、个数及气孔外拱盖的有

表Ⅳ 27 种苏铁属植物各气孔参数的均值±标准误
Means and standard errors for each stomatal trait of *Cycas*

物种 Species	气孔密度 SD (/mm ²)	气孔指数 SI (%)	气孔口长 SPL (μm)	气孔口宽 SPW (μm)	气孔口长宽比 R	气孔口面积 SPA (μm ²)
XTBG						
<i>Cycas balansae</i>	67±2	5.77±0.09	33.07±0.91	18.57±0.46	1.80±0.05	491.26±22.30
<i>C. changjiangensis</i>	55±2	5.38±0.12	36.06±0.54	16.08±0.32	2.27±0.06	464.51±10.17
<i>C. diannanensis</i>	72±2	5.82±0.12	30.31±0.59	17.50±0.38	1.77±0.06	417.08±10.23
<i>C. fairylakea</i>	70±3	5.96±0.13	31.13±0.51	19.91±0.23	1.57±0.03	491.30±8.70
<i>C. guizhouensis</i>	50±2	4.97±0.08	30.31±0.44	18.26±0.32	1.68±0.03	453.75±10.51
<i>C. hainanensis</i>	62±1	5.49±0.08	34.98±0.53	18.82±0.32	1.87±0.04	521.81±12.06
<i>C. hongheensis</i>	75±1	5.54±0.10	34.32±0.47	17.62±0.40	1.99±0.06	484.44±13.83
<i>C. micholitzii</i>	69±3	6.15±0.14	30.53±0.52	18.79±0.40	1.66±0.05	439.06±9.19
<i>C. panzhihuaensis</i>	76±2	4.99±0.09	34.76±0.85	24.82±0.65	1.43±0.05	653.81±29.02
<i>C. parvula</i>	68±2	5.72±0.07	28.74±0.48	16.22±0.36	1.81±0.06	371.78±8.74
<i>C. pectinata</i>	69±2	6.18±0.12	33.84±0.39	18.55±0.52	1.88±0.06	510.79±15.37
<i>C. segmentifida</i>	68±2	6.37±0.08	30.80±0.47	17.95±0.29	1.74±0.04	429.56±8.24
<i>C. sexseminifera</i>	65±3	5.46±0.16	35.28±0.54	22.43±0.35	1.59±0.04	633.05±13.21
<i>C. siamensis</i>	82±2	7.76±0.15	36.68±1.08	16.19±0.46	2.24±0.10	507.89±19.9
<i>C. szechuanensis</i>	54±2	5.88±0.1	33.42±0.47	21.08±0.35	1.60±0.03	554.99±1.19
FBG						
<i>Cycas debaoensis</i>	64±3	5.71±0.13	28.23±0.70	18.22±0.53	1.58±0.05	405.88±18.47
<i>C. diannanensis</i>	52±1	5.45±0.11	28.95±0.46	17.95±0.40	1.64±0.04	403.09±9.14
<i>C. elongata</i>	80±2	6.14±0.09	37.74±0.63	17.64±0.38	2.17±0.05	515.33±11.37
<i>C. fairylakea</i>	58±1	6.06±0.11	31.10±0.63	19.19±0.25	1.63±0.04	429.90±9.32
<i>C. ferruginea</i>	94±2	6.99±0.08	27.26±0.46	17.24±0.41	1.61±0.05	360.03±8.85
<i>C. guizhouensis</i>	66±2	4.86±0.07	32.35±0.96	23.25±0.69	1.44±0.07	584.84±20.69
<i>C. hainanensis</i>	69±1	5.71±0.06	36.37±0.59	20.78±0.53	1.80±0.06	561.52±14.45
<i>C. hongheensis</i>	67±4	5.43±0.16	32.70±0.63	19.35±0.60	1.76±0.07	484.71±16.05
<i>C. media</i>	81±2	5.31±0.11	33.65±0.61	17.60±0.66	2.00±0.08	503.57±20.61
<i>C. micholitzii</i>	47±3	5.84±0.11	32.54±0.59	20.50±0.47	1.62±0.06	524.09±14.21
<i>C. multipinnata</i>	61±2	5.41±0.12	37.09±0.74	21.43±0.39	1.75±0.05	625.99±15.17
<i>C. panzhihuaensis</i>	69±2	4.96±0.06	33.45±0.92	21.60±0.70	1.60±0.06	544.00±22.03
<i>C. parvula</i>	68±3	5.66±0.13	29.55±0.57	18.88±0.39	1.59±0.05	409.37±59.94
<i>C. pectinata</i>	63±1	5.62±0.10	37.26±0.64	17.60±0.60	2.17±0.06	533.81±22.85
<i>C. revoluta</i>	87±2	4.92±0.09	34.11±1.70	24.48±4.97	1.84±0.14	531.75±59.53
<i>C. rumphii</i>	70±1	5.08±0.07	44.56±0.97	22.28±0.46	2.02±0.05	729.71±19.69
<i>C. seemannii</i>	81±2	4.69±0.08	27.70±0.64	16.96±0.31	1.65±0.05	363.39±10.39
<i>C. segmentifida</i>	47±2	5.84±0.14	33.80±0.67	18.37±0.32	1.86±0.05	491.19±10.74
<i>C. sexseminifera</i>	49±2	5.29±0.08	38.19±0.59	21.83±0.40	1.77±0.04	628.91±14.63
<i>C. shiwandashanica</i>	50±2	5.32±0.10	33.56±0.52	20.57±0.45	1.66±0.04	512.36±11.78
<i>C. siamensis</i>	79±3	7.66±0.17	39.04±0.74	16.49±1.00	2.57±0.13	495.53±15.63
<i>C. simplicipinna</i>	50±2	5.76±0.10	30.96±0.66	19.49±0.28	1.60±0.04	459.26±12.02
<i>C. szechuanensis</i>	70±3	6.59±0.15	35.15±11.45	20.70±0.55	1.71±0.30	535.98±0.04
<i>C. taitungensis</i>	95±2	5.32±0.07	25.34±0.73	17.19±0.64	1.52±0.06	334.35±18.65
<i>C. thouarsii</i>	57±2	5.11±0.10	48.69±0.92	19.80±0.47	2.51±0.08	701.87±19.86

SD: stomatal density; SI: stomatal index; SPL: stomatal pore length; SPW: stomatal pore width; R: the ratio of stomatal pore length and width; SPA: stomatal pore area.

无)可将 13 种苏铁属植物划分为两类;陈谭清等(1996)主要依据近轴面下皮层厚壁细胞特征、中脉解剖特征及气孔孔缘等将 18 种苏铁属植物划分为三类;Griffith 等(2014)主要依据叶表皮细胞特征(形状、大小及垂周壁式样)将 48 种苏铁属植物划分为三类,并发现叶表皮类型与系统发育有一定相关性。上述叶表皮类型的划分,由于研究者参照的划分依据不同,所以相同的物种,其叶表皮的形态归类因人而异。本文在参照前人观察结果的基础上,有了更多的叶表皮归类依据;同时整合了上、下叶表皮

及气孔特征,并首次加入了气孔簇特征(插图 1)将 27 种苏铁属植物划分到四种叶表皮类型中。

本文在参照 Hill(2008)的分类基础上,将四种叶表皮类型简单映射到 Liu 等(2018)基于全面广泛采样所构建的苏铁植物系统发育树上,发现叶表皮类型与系统发育存在一定的相关性,但叶表皮类型并不能完全解释属下各分支的系统演化关系(插图 3)。本文结果与 Griffith 等(2014)结果相似,其基于 Nagalingum 等(2011)所构建的系统发育树,发现苏铁属羽片解剖特征仅能解释部分系统分支关

表 V 同一栽培环境下(FBG)25 种苏铁属植物气孔参数的系统发育信号

Phylogenetic signal of stomatal parameters of 25 *Cycas* species under the same cultivated condition in FBG

气孔参数 Stomatal parameter	单位 Units	Blomberg's K	
		K-values	p-values
SD	No. / mm ²	0.53	0.54
SI	%	0.91	0.03
SPL	μm	0.23	0.96
SPW	μm	0.61	0.37
R1	—	0.38	0.76
SPA	μm ²	0.27	0.95

K 值在 $p < 0.05$ 水平显著。SD 为气孔密度, SI 为气孔指数, SPL 为气孔口长度, SPW 为气孔口宽度, SPA 为气孔口面积, R 为气孔口长度和宽度比。

K-value is significantly at $p < 0.05$ level. SD (stomatal density), SI (stomatal index), SPL (stomatal pore length), SPW (stomatal pore width), SPA (stomatal pore area), R (the ratio of stomatal pore length and width).

系。在本文结果中, 东方苏铁组 (Sect. *Asiorientales*) 与攀枝花苏铁组 (Sect. *Panzhihuaenses*) 具有相同的表皮类型 1, 并且其气孔邻近一圈表皮细胞加密, 突出于表皮层而形成孔口较小的气孔窝穴的气孔特征是明显有别于苏铁属内其他物种的一个重要特征, 这验证了前人宏观形态及解剖学观察的结果 (王玉忠、陈家瑞, 1995; 陈谭清等, 1996; 黄玉源, 2001; Hill, 2008)。蕨叶苏铁组 (Sect. *Stagerioides*) 大部分物种具有相同的叶表皮类型 4, 但锈毛苏铁 (*C. ferruginea*) 却表现为表皮类型 3, 其表皮细胞的形状、大小及垂周壁弯曲程度都介于类型 1 和 4 之间。暹罗苏铁组 (Sect. *Indonesienses*) 下 4 个物种表现出两种表皮类型 3 和 4; 拳叶苏铁组 (Set. *Cycas*) 下 4 个物种虽然具有相同的表皮类型 2, 但由于本文对暹罗苏铁组和拳叶苏铁组的研究物种数有限, 对叶表皮类型在这两个组下的分布情况的规律还有待进一步研究。综上所述, 苏铁属植物的叶表皮类型与系统发育存在一定的相关性, 但详细的叶表皮特征与系统发育关系的探讨, 还有待进一步扩大研究物种数并结合其他手段开展综合研究。

4.2 叶表皮类型与原生生境的关系

本文划分的四种叶表皮类型与其长期分布的原生生境特征相关: 具旱生型特征的表皮类型 1 和 3 物种对应干旱贫瘠且植被开阔的原生生境, 而旱生型特征不明显的表皮类型 4 物种对应的是荫蔽湿润的原生生境 (插图 3), 这与王玉忠和陈家瑞 (1995) 认为苏铁属的叶表皮特征与生态环境关系密切的观点相一致。

植物的叶表皮特征要适应开阔干旱的环境, 通

常表现为厚的角质层或蜡质 (孙柏年等, 2009)、表皮细胞较小且垂周壁平直 (Watson, 1942; Kürschner, 1997)、具气孔簇 (Tang *et al.*, 2002; Gan *et al.*, 2010)、气孔下陷和气孔隐窝 (Jordan *et al.*, 2008) 等特征, 这些特征的不同组合则构成了旱生型植物的综合特点。在本文中表皮类型 1 和 3 物种表现出的旱生特征为表皮细胞较小且垂周壁平直、气孔下陷明显且具气孔簇。表皮类型 2 虽与类型 1 的近轴面特征相似, 但气孔下陷程度不如类型 1 明显, 可能是气孔深陷的特征为东方苏铁组和攀枝花苏铁组分类单元下的特有特征, 与环境无关; 其次, 气孔深陷特征也曾被认为是一种耐寒适应, 类型 1 的三个物种 (苏铁、攀枝花苏铁和台东苏铁) 是我国分布最北界的苏铁植物 (黄玉源, 2001), 而类型 2 物种均分布于热带近海岸地区, 光热充足、雨量充沛。气孔簇被认为与植物的抗逆性有关, 它能提高植物对 CO_2 的吸收, 降低水分散失从而提高植物抗旱、抗盐碱和耐贫瘠等能力 (Tang *et al.*, 2002; Gan *et al.*, 2010; Panatsiou *et al.*, 2017), 苏俊霞等 (2003) 曾报道了鳞秕泽米铁的气孔簇现象, 并认为其是对干旱的适应, 本文中表皮类型 1、2 和 3 物种也存在近似气孔簇现象, 这或与其生境的干旱贫瘠有关。但对于原生生境为近海岸地区的类型 2 物种, 气孔簇更可能是对盐碱地的一种“生理干旱”适应。对于表皮类型 4 的物种, 其多生长在光照弱、湿度高的热带雨林或常绿阔叶林环境之下, 因此, 表现出更为接近阴生植物的叶表皮特征: 表皮细胞形状为长矩形, 气孔稍下陷, 且垂周壁比前三种类型更明显波状弯曲。综上所述, 苏铁属的叶表皮特征与其原生生境相关, 其中, 表皮类型 1 和 3 物种较类型 4 物种更适应于干旱贫瘠、植被开阔的环境, 因此, 苏铁属叶片表皮类型能够大致反映其原生生长环境状况。

上述叶表皮特征与生境的对应关系表明, 叶表皮特征在一定程度上或对古环境具有一定的指示作用: 对于苏铁类植物, 叶表皮细胞较小且垂周壁平直、气孔深陷和气孔簇等组合特征, 反映的是一种干旱、植被开阔的环境; 而表皮细胞延长、垂周壁波状弯曲, 无气孔下陷及无气孔簇等组合特征出现时, 可能反映的是植被荫蔽、湿润的环境。但需注意的是: 叶表皮特征往往不止与一种环境压力相关 (Haworth and McElwain, 2008), 某些特征还可能是某分类单元的特有特征 (孙柏年等, 2009), 因此, 对叶表皮特征做单一的生态解释或仅凭单一的叶表皮特征指示古环境时需要谨慎对待。

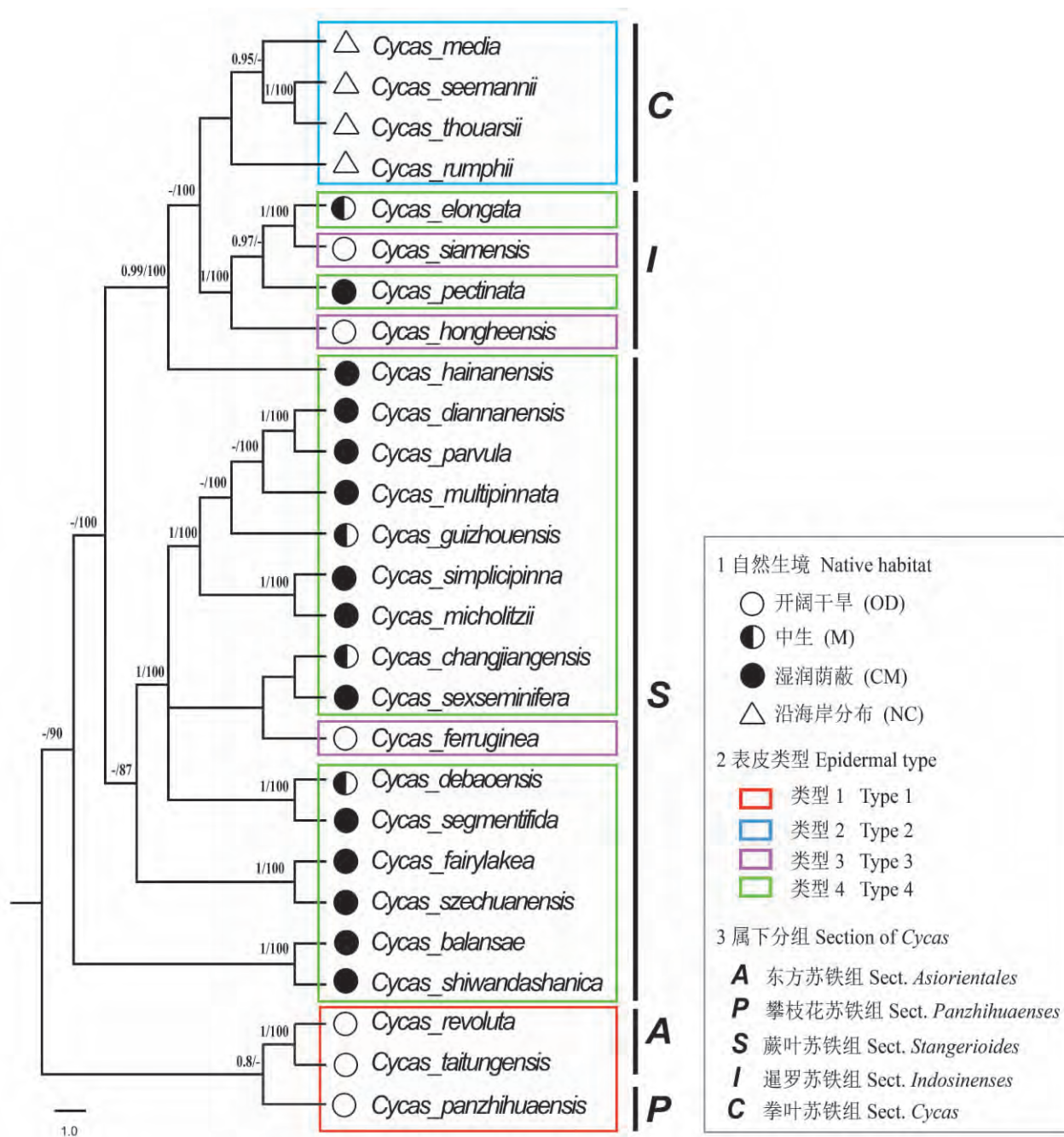


插图 3 27 种苏铁属植物系统发育关系、叶表皮形态及其自然生境信息

Phylogenetic relationships, leaf epidermal morphology and ecological information across 27 *Cycas* species

联合了 7 个单低拷贝核基因片段和 3 个叶绿体基因间隔区序列构建的贝叶斯树引自 Liu 等(2018)。各分支上的数值分别代表贝叶斯分析的后验概率(PP)和最大似然法的靴带值(BP), PP<0.95 和 BP<70 未在图上标出。

Phylogram is cited from Liu *et al.* (2018) by using seven low-copy nuclear genes and four chloroplast intergenic spacers based on Bayesian Inference. The numbers on the branches represent Bayesian Posterior Probability (PP)/Maximum Likelihood bootstrap values (BP). The support values of PP<0.95 and BP<70 are not indicated in the cladogram.

4.3 气孔参数在属内的变化及其对古大气 CO₂ 浓度重建的启示

我们的研究材料均采自植物园栽培环境之下,与生长在野外的植物相比,已最大限度地减小了由

环境异质性所造成气孔参数的种间差异(Zhang *et al.*, 2012),但结果显示:即使控制在相同环境下(在XTBG 或 FBG 采样点),气孔参数在属内仍表现出显著的种间差异(表Ⅲ);SD 与 SI 在属内的变化与叶表皮类型有一定的关系(表Ⅲ),而其余四个气孔

性状参数(SPL、SPW、R 和 SPA)均与叶表皮类型无关(表Ⅲ);SI 受系统发育显著影响,而 SD 与其他气孔性状参数受系统发育影响较小。

对于 SD,表皮类型 4 物种较类型 1 具有显著更低的值,由前文所述可知,表皮类型 4 较类型 1 的物种更适应于荫蔽湿润的生境,这与前人研究结果相一致,即植物在遮阴(Gerardin *et al.*, 2018)或水分充足(Clifford *et al.*, 1995)环境下具有较低的 SD 值。对于 SI,表皮类型 3 较其他类型的物种虽具有显著较高的值,但该类型内物种间 SI 的水平却相差甚远:其中暹罗苏铁(*C. siamensis*)与锈毛苏铁(*C. ferruginea*)具有明显高于整体水平($5.64\% \pm 0.30\%$)的 SI 值,其均值分别为 $6.99\% \pm 0.08\%$ 、 $7.66\% \pm 0.17\%$ 。在本文中,SD 与 SI 在属内的变化虽均表现出与叶表皮类型具有一定的关系,但同一表皮类型中,气孔参数仍表现出一定的种间特异性,即具有相似叶表皮类型的物种,其气孔参数未必相似。而相同环境下,气孔参数在属内存在种间差异,或许意味着其 SD/SI 与大气 CO₂ 浓度变化的相关关系也存在种间差异。Haworth 等(2010)曾对 6 种柏科(Cupressaceae)植物进行过 SI 与 CO₂ 浓度关系分析,发现这些植物尽管在生态型或叶形态上相似,但其 SI 对 CO₂ 浓度变化的响应关系却不一致。上述可见,在科甚至属一级水平下,仍有叶表皮形态相似但其气孔参数或 SD/SI- $p\text{CO}_2$ 关系具种间差异的情况存在。因此,气孔参数法重建古 CO₂ 浓度时,不能仅凭植物的生境或叶表皮形态相似而选定其作为化石对应的现生代理种,并推测其气孔参数或 SD/SI-CO₂ 关系相似,否则结果可能会出现巨大偏差。

本文系统发育信号检测结果显示,SD、SPL、SPW、SPA 及 SPL 等其他气孔参数受系统发育影响不明显,这与 Woodward 和 Kelly(1995)曾对 100 种已发表植物的 SD 调查结果相似,即植物的系统演化关系与 SD 无显著相关关系。而 SI 却受到显著较强的系统发育影响,表明 SI 具有系统发育保守性,更不易于受到环境因子的影响。Sun 等(2003)分析了我国不同地区现生银杏气孔参数与气候的关系,认为 SD 对气候(降雨和相对湿度)的变化较 SI 表现得更为敏感。此外,Sun 等(2003)的结果也显示了银杏的 SI 对大气 CO₂ 浓度变化的响应比其对气候的响应更为明显。而对于苏铁植物是否也存在相似结果,还有待未来研究结合大气 CO₂ 浓度的数据进行分析。其次,SI 受较强的系统发育影响,也

表明其对环境变化做出的响应规律(如 SI- $p\text{CO}_2$ 相关关系)不易随着进化过程而发生较大改变,暗示了亲缘关系越相近的物种,其 SI 或 SI- $p\text{CO}_2$ 关系也更相似。在气孔参数法中,代理种的选定在严格意义上是要选择与化石种在亲缘关系上最近的物种(最近亲缘种),但往往受限于化石材料所反映的分类信息不全,对化石种的鉴定会有一定程度的偏差,其次,SI 与 $p\text{CO}_2$ 的关系又存在种间特异性,能否准确选择代理种对重建古大气 CO₂ 浓度的结果至关重要。因此,最近亲缘种的选定过程需在对化石进行全面研究、仔细鉴定的基础上,慎重考虑物种间的亲缘关系,准确确定最近现生亲缘种,综合属内多个物种进行交叉验证,才能有效地降低由于 SI- $p\text{CO}_2$ 关系的种间差异所造成的结果偏差。

5 结 论

本文对植物园栽培环境下的 27 种苏铁属植物的叶表皮特征及气孔参数差异分析结果表明:(1)苏铁属内叶表皮特征稳定,具有一定的分类学意义,可为现生苏铁或化石的鉴定提供参考;(2)划分的四种叶表皮类型指示了不同的原生生境特征,对古环境或古生态具有一定的指示意义;(3)即使在同一环境下,属内气孔参数仍存在种间差异,并与叶表皮类型存在一定的关系;其次,SI 具有显著的系统发育信号,其在属内的变化与系统发育相关,但其余参数的系统发育信号不显著。该结果表明:即使在属一级水平下,仍需考虑系统发育关系,选择亲缘关系相近且叶表皮及生境特征相似的数个代理种进行结果的交叉验证,并明确气孔参数与大气 CO₂ 分压的相关关系在种间的异同,从而提高气孔参数法的有效性。

致谢 中国科学院昆明植物研究所刘健博士为本文提供苏铁属系统发育树;评审专家提出宝贵修改意见,特此致谢。

参 考 文 献 (References)

- Axsmith B J, Jacobs B, 2005. The conifer *Frenelopsis ramosissima* (Cheirolepidiaceae) in the lower Cretaceous of Texas: systematic, biogeographical, and paleoecological implications. *International Journal of Plant Sciences*, **166**(2): 327–337.
- Bai Yun-jun, Chen Li-qun, Rahnatra P S, Wang Qing, Wang Yufei, Li Chen-sen, 2015. Reconstructing atmospheric CO₂ during the Plio-Pleistocene transition by fossil *Typha*. *Global Change*

- Biology, **21**(2): 874–881.
- Beerling D J, Royer D L, 2011. Convergent Cenozoic CO₂ history. *Nature Geoscience*, **4**(7): 418–420.
- Blomberg S P, Garland T J, Ives A R, 2003. Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution*, **57**(4): 717–745.
- Bush R T, Wallace J, Currano E D, Jacobs B F, Mcinerney F A, Dunn R E, Tabor N J, 2017. Cell anatomy and leaf $\delta^{13}\text{C}$ as proxies for shading and canopy structure in a Miocene forest from Ethiopia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **485**(2017): 593–604.
- Calonje M, Stevenson D W, Osborne R, 2013–2019. The World List of Cycads. Online Edition. Available from: <http://www.cycadlist.org>.
- Chen Tan-qing(陈潭清), Wang Ding-yue(王定跃), Liao Jing-ping(廖景平), Yang Qing-feng(杨庆峰), Wu Qi-gen(吴七根), Chen Ze-lian(陈泽廉), 1996. Morphology and anatomy on *Cycas* in China. In: Wang Fa-xiang(王发祥), Liang Hui-bo(梁惠波)(eds.), *Cycads in China*. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press. 143–189 (in Chinese and English).
- Clifford S C, Black C R, Roberts J A, Stronach I M, Singleton Jones P R, Mohamed A D, Azamali S N, 1995. The effect of elevated atmospheric CO₂ and drought on stomatal frequency in groundnut (*Arachis hypogaea* (L.)). *Journal of Experimental Botany*, **46**(288): 847–852.
- Dunn R E, Le Thien-Y T, Stromberg C A E, 2015a. Light environment and epidermal cell morphology in grasses. *International Journal of Plant Sciences*, **176**(9): 832–847.
- Dunn R E, Stromberg C A E, Madden R H, Kohn M J, Carlini A A, 2015b. Linked canopy, climate, and faunal change in the Cenozoic of Patagonia. *Science*, **347**(6219): 258–261.
- Eide W, Brirks H H, 2006. Stomatal frequency of *Betula pubescens* and *Pinus sylvestris* shows no proportional relationship with atmospheric CO₂ concentration. *Nordic Journal of Botany*, **24**(3): 327–339.
- Erdei B, Calonje M, Hendy A, Espinoza N, 2018. A review of the Cenozoic fossil record of the genus *Zamia* L. (Zamiaceae, Cycadales) with recognition of a new species from the late Eocene of Panama-evolution and biogeographic inferences. *Bulletin of Geosciences*, **93**(2): 185–204.
- Finsinger W, Wagner-Cremer F, 2009. Stomatal-based inference models for reconstruction of atmospheric CO₂ concentration: a method assessment using a calibration and validation approach. *The Holocene*, **19**(5): 757–764.
- Gan Yi, Zhou Lei, Shen Zhong-ji, Shen Zhu-xia, Zhang Yi-qiong, Wang Gen-xuan, 2010. Stomatal clustering, a new marker for environmental perception and adaptation in terrestrial plants. *Botanical Studies*, **51**: 325–336.
- Gerardin T, Douthe C, Flexas J, Brendel O, 2018. Shade and drought growth conditions strongly impact dynamic responses of stomata to variations in irradiance in *Nicotiana tabacum*. *Environmental and Experimental Botany*, **153**: 188–197.
- Greguss P, 1968. *Xylotomy of the Living Cycads, with A Description of Their Leaves and Epidermis*. Budapest: Akadémiai Kiadó Press. 1–255.
- Griffith M P, Magellan T M, Tomlinson P B, 2014. Variation in leaflet structure in *Cycas* (Cycadales: Cycadaceae): does anatomy follow phylogeny and geography? *International Journal of Plant Sciences*, **175**(2): 241–255.
- Haworth M, Fitzgerald A, McElwain J C, 2011. Cycads show no stomatal-density and index response to elevated carbon dioxide and subambient oxygen. *Australian Journal of Botany*, **59**(7): 630–638.
- Haworth M, Heath J, McElwain J C, 2010. Differences in the response sensitivity of stomatal index to atmospheric CO₂ among four genera of Cupressaceae conifers. *Annals of Botany*, **105**(3): 411–418.
- Haworth M, McElwain J C, 2008. Hot, dry, wet, cold or toxic? Revisiting the ecological significance of leaf and cuticular micro-morphology. *Allergy*, **262**(1): 79–90.
- He Xin-qiang(贺新强), Lin Yue-hui(林月惠), Lin Jin-xing(林金星), Hu Yu-xi(胡玉熹), 1998. The analysis of correlation between stomatal density and changes in atmospheric CO₂ concentration in the last century. *Chinese Science Bulletin(科学通报)*, **43**: 860–862 (in Chinese with English abstract).
- Hill K D, 2004. Character evolution, species recognition and classification concepts in the Cycadaceae. In: Walters T, Osborne R (eds.), *Cycad Classification: Concepts and Recommendations*. Wallingford: Commonwealth Agricultural Bureaux(CABI) Publishing Press. 23–44.
- Hill K D, 2008. The genus *Cycas* (Cycadaceae) in China. *Telopea*, **12**(1): 71–118.
- Hill K D, Stanberg L C, 1999. Epicuticular waxes in the Cycadales and their systematic implications. In: Chen Jia-rui(陈家瑞)(ed.), *Biology and Conservation of Cycads-Proceeding of the Fourth International Conference on Cycad Biology*(Panzhihua, China). Beijing: International Academic Publishers. 159–174.
- Hill R S, 1998. Fossil evidence for the onset of xeromorphy and scleromorphy in Proteaceae. *Australian Systematic Botany*, **11**(4): 391–400.
- Hollick A, 1932. Descriptions of new species of Tertiary Cycads, with a review of those previously recorded. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, **59**(4): 169–189.
- Hu Jin-jin, Xing Yao-wu, Turkington R, Jacques F M, Su Tao, Huang Yong-jiang, Zhou Zhe-kun, 2015. A new positive relationship between $p\text{CO}_2$ and stomatal frequency in *Quercus guyaviifolia* (Fagaceae): a potential proxy for palaeo-CO₂ levels. *Annals of Botany*, **115**(5): 777–788.
- Huang Hua-sheng(黄华生), Hu Jin-jin(胡瑾瑾), Su Tao(苏涛), Zhou Zhe-kun(周浙昆), 2016. The occurrence of *Quercus heqingensis* n. sp. and its application to palaeo-CO₂ estimates. *Chinese Science Bulletin(科学通报)*, **61**: 1354–1364 (in Chinese with English abstract).
- Huang Yu-yuan(黄玉源), 2001. Studies on systematics and evolu-

- tion of Cycadaceae of China. Beijing: China Meteorological Press. 1—229 (in Chinese with English abstract).
- Jordan G J, 2011. A critical framework for the assessment of biological palaeoproxies: predicting past climate and levels of atmospheric CO₂ from fossil leaves. *New Phytologist*, **192**: 29—44.
- Jordan G J, Carpenter R J, Brodribb T J, 2014. Using fossil leaves as evidence for open vegetation. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **395**: 168—175.
- Jordan G J, Weston P H, Carpenter R J, Dillon R A, Brodribb T J, 2008. The evolutionary relations of sunken, covered, and encrypted stomata to dry habitats in Proteaceae. *American Journal of Botany*, **95**(5): 521—530.
- Kürschner W M, 1997. The anatomical diversity of recent and fossil leaves of the durmast oak (*Quercus petraea* Lieblein/*Q. pseudocastanea* Goepfert)—Implications for their use as biosensors of palaeoatmospheric CO₂ levels. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **96**: 1—30.
- Krassilov V, 1978. Late Cretaceous gymnosperms from Sakhalin and the terminal Cretaceous event. *Palaeontology*, **21**: 893—905.
- Krober W, Heklau H, Bruelheide H, 2015. Leaf morphology of 40 evergreen and deciduous broadleaved subtropical tree species and relationships to functional ecophysiological traits. *Plant Biology*, **17**(2): 373—383.
- Liu Jian, Zhang Shou-zhou, Nagalingum N S, Chiang Yu-chung, Lindstrom A J, Gong Xun, 2018. Phylogeny of the gymnosperm genus *Cycas* L. (Cycadaceae) as inferred from plastid and nuclear loci based on a large-scale sampling: Evolutionary relationships and taxonomical implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **127**: 87—97.
- Liu X Y, Gao Q, Han M, Jin J H, 2016. Estimates of late middle Eocene *p*CO₂ based on stomatal density of modern and fossil *Nageia* leaves. *Climate of the Past*, **12**(2): 241—253.
- Magallon S, Hilu K W, Quandt D, 2013. Land plant evolutionary timeline: gene effects are secondary to fossil constraints in relaxed clock estimation of age and substitution rates. *American Journal of Botany*, **100**(3): 556—573.
- McElwain J C, Beerling D J, Chaloner W G, Woodward F I, 1998. Do fossil plants signal palaeoatmospheric carbon dioxide concentration in the geological past? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **353**(1365): 83—96.
- McElwain J C, Beerling D J, Woodward F I, 1999. Fossil plants and global warming at the Triassic-Jurassic boundary. *Science*, **285**: 1386—1390.
- McElwain J C, Chaloner W G, 1996. The fossil cuticle as a skeletal record of environmental changes. *Palaos*, **11**(4): 376—388.
- McElwain J C, Steinthorsdottir M, 2017. Paleocology, ploidy, palaeoatmospheric composition, and developmental biology: A review of the multiple uses of fossil stomata. *Plant Physiology*, **174**(2): 650—664.
- Mickle J E, Lumaga M R B, Moretti A, De Luca P, 2011. Scanning electron microscopy studies of cuticle micromorphology in *Cycas* L. (Cycadaceae). *Plant Biosystems*, **145**: 191—201.
- Nagalingum N S, Marshall C R, Quental T B, Rai H S, Little D P, Mathews S, 2011. Recent synchronous radiation of a living fossil. *Science*, **334**: 796—799.
- Pant D D, Nautiyal D D, 1963. Cuticle and epidermis of recent Cycadales leaves, sporangia and seeds. *Senckenberg Biology*, **44**: 257—348.
- Papanatsiou M, Amtmann A, Blatt M R, 2017. Stomatal clustering in *Begonia* associates with the kinetics of leaf gaseous exchange and influences water use efficiency. *Journal of Experimental Botany*, **68**(9): 2309—2315.
- Penuelas J, 1990. Changes in N and S leaf content, stomatal density and specific leaf area of 14 plant species during the last three centuries of CO₂ increase. *Journal of Aoac International*, **41**: 1119—1124.
- Poole I, Kürschner W M, 1999. Stomatal density and index: the practice. *In*: Jones T P, Rowe N P (eds.), *Fossil Plants and Spores: Modern Techniques*. London: Geological Society. 257—260.
- Quan Cheng, Sun Chun-lin, Sun Yue-wu, Sun Ge, 2009. High resolution estimates of paleo-CO₂ levels through the Campanian (Late Cretaceous) based on *Ginkgo* cuticles. *Cretaceous Research*, **30**(2): 424—428.
- Retallack G J, 2001. A 300-million-year record of atmospheric carbon dioxide from fossil plant cuticles. *Nature*, **411**: 287—290.
- Revell L J, 2012. Phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*, **3**: 217—223.
- Royer D L, 2001. Stomatal density and stomatal index as indicators of paleoatmospheric CO₂ concentration. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **114**(1): 1—28.
- Royer D L, 2003. Estimating latest Cretaceous and Tertiary atmospheric CO₂ concentration from stomatal indices. *Geological Society of America*, **369**: 79—93.
- Royer D L, Wing S L, Beerlig D J, Jolley D W, Koch P L, Hickey L J, Berner R A, 2001. Paleobotanical evidence for near present-day levels of atmospheric CO₂ during part of the tertiary. *Science*, **292**: 2310—2313.
- Rudall P J, Jason H, Bateman R M, 2013. Several developmental and morphogenetic factors govern the evolution of stomatal patterning in land plants. *New Phytologist*, **200**: 598—614.
- Stace C A, 1965. Cuticular studies as an aid to plant taxonomy. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Botany Series*, **4**: 3—78.
- Stace C A, 1984. The taxonomic importance of the leaf surface. *In*: Heywood V H, Moore D M (eds.), *Current Concepts in Plant Taxonomy*. London: Academic Press. 67—94.
- Steinthorsdottir M, Elliott-Kingston C, Bacon K L, 2018. Cuticle surfaces of fossil plants as a potential proxy for volcanic SO₂ emissions: observations from the Triassic-Jurassic transition of East Greenland. *Palaeobiodiversity and Palaeoenvironments*, **98**(1): 49—69.

- Stewart J D, Hoddinott J, 1993. Photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂ and UV radiation in *Pinus banksiana*. *Physiologia Plantarum*, **88**: 493–500.
- Su Jun-xia(苏俊霞), Liao Fen(廖 芬), Huang Yu-yuan(黄玉源), Lin Jian-zhao(林鉴钊), 2003. The leaf epidermis of three species in Zamiaceae. *Acta Botanica Yunnanica*(云南植物研究), **25**(5): 596–602 (in Chinese with English abstract).
- Su Kui, Quan Chen, Liu Yu-sheng, 2014. *Cycas fushunensis* sp. nov. (Cycadaceae) from the Eocene of northeast China. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **204**: 43–49.
- Sun Bai-nian, Dilcher D, Beerling D, Zhang Cheng-jun, Yan De-fei, Kowalski E, 2003. Variation in *Ginkgo biloba* L. leaf characters across a climatic gradient in China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(12): 7141–7146.
- Sun Bai-nian(孙柏年), Yan De-fei(闫德飞), Xie San-ping(解三平), Wang Yong-dong(王永栋), 2009. Analysis and Application of Stomatal and Carbon Isotope in Fossil Plants. Beijing: Science Press. 1–220 (in Chinese).
- Tang Min, Hu Yu-xin, Lin Jin-xing, Jin Xiao-bai, 2002. Developmental mechanism and distribution pattern of stomatal clusters in *Begonia peltatifolia*. *Acta Botanica Sinica*, **44**(4): 384–390.
- Thomas H H, Bancroft N, 1913. Vi on the cuticles of some recent and fossil Cycadean fronds. *Transactions of the Linnean Society of London, Second Series: Botany*, **8**: 155–204.
- Van der Burgh J, Visscher H, Dilcher D L, Kürschner W M, 1993. Paleatmospheric signatures in Neogene fossil leaves. *Science*, **260**(5115): 1788–1790.
- Wagner F, Bohncke S J P, Dilcher D L, Kürschner W M, Geel B V, Visscher H, 1999. Century-scale shifts in Early Holocene atmospheric CO₂ concentration. *Science*, **284**: 1971–1973.
- Wagner-Cremer F, Finsinger W, Moberg A, 2010. Tracing growing degree-day changes in the cuticle morphology of *Betula nana* leaves: a new micro-phenological palaeo-proxy. *Journal of Quaternary Science*, **25**(6): 1008–1017.
- Wang Yu-qing, Ito A, Huang Yong-jiang, Fukushima T, Wakamatsu N, Momohara A, 2018. Reconstruction of altitudinal transportation range of leaves based on stomatal evidence: An example of the Early Pleistocene *Fagus* leaf fossils from central Japan. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **505**: 317–325.
- Wang Yu-qing, Momohara A, Wang Li, Lebreton-Anberree J, Zhou Zhe-kun, 2015. Evolutionary history of atmospheric CO₂ during the Late Cenozoic from fossilized *Metasequoia* Needles. *Plos One*, **10**: e0130941.
- Wang Yu-zhong(王玉忠), Chen Jia-rui(陈家瑞), 1995. Leaf epidermal characters of the *Cycas* in China and their taxonomic significance. *Bulletin of Botany*(植物学通报), **12**: 47–51 (in Chinese with English abstract).
- Watson R W, 1942. The effect of cuticular hardening on the form of epidermal cells. *New Phytologist*, **41**: 223–229.
- Woodward F I, 1987. Stomatal numbers are sensitive to increases in CO₂ from pre-industrial levels. *Nature*, **327**: 617–618.
- Woodward F I, Bazzaz F A, 1988. The responses of stomatal density to CO₂ partial pressure. *Journal of Experimental Botany*, **39**: 1771–1781.
- Woodward F I, Kelly C K, 1995. The influence of CO₂ concentration on stomatal density. *New Phytologist*, **131**: 311–327.
- Worsdell W C, 1898. The comparative anatomy of certain genera of the Cycadaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **33**: 437–457.
- Yang Qing-song(杨青松), Dong You-yan(董有彦), Zhao Yan(赵艳), 2012. A comparison of *Quercus aquifolioides* leaf epidermal morphological characteristics in different ecological environments. *Journal of Yunnan Minzu University (Natural Sciences Edition)*(云南民族大学学报, 自然科学版), **21**: 93–97 (in Chinese with English abstract).
- Yang Yong(杨 永), Wang Zhi-heng(王志恒), Xu Xiao-ting(徐晓婷), 2017. Taxonomy and Distribution of Global Gymnosperms. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers. 1–1223 (in Chinese).
- Yokoyama M, 1911. Some Tertiary fossils from the Miike coal-field. *Journal of the College Science, Imperial University, Tokyo*, **27**: 1–16.
- Zhang Shi-bao, Guan Zhi-jie, Sun Mei, Zhang Juan-juan, Cao Kun-fang, Hu Hong, 2012. Evolutionary association of stomatal traits with leaf vein density in *Paphiopedilum*, *Orchidaceae*. *Plos One*, **7**: e40080.

PATTERN OF LEAF EPIDERMAL CHARACTERS IN *CYCAS* AND ITS SIGNIFICANCE OF TAXONOMY AND PALEOECOLOGY

LIANG Shui-qing^{1, 2)}, SU Tao¹⁾, HU Jin-jin¹⁾ and LI Nan³⁾

1) CAS Key Laboratory of Tropical Forest Ecology, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden,

Chinese Academy of Sciences, Mengla 666303, China;

2) University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3) Shenzhen Fairy Lake Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518004, China

Key words *Cycas*, epidermis, stomatal parameters, phylogenetic signal, palaeoenvironment, palaeo-CO₂ concentration

Abstract

Cycas is a group of gymnosperms with a long evolutionary history. This study is to investigate the relationship between the leaf epidermal morphology of *Cycas* and the environment to provide fundamental evidences for palaeo-environmental reconstructions. In this study, we compared the epidermal characters and stomatal parameters of 27 *Cycas* species in the garden culturing environment and then analyzed the phylogenetic signals of stomatal parameters. The present study mainly found that: 1) the epidermal characters of *Cycas* were generally conservative within species and it has taxonomic significance. These 27 *Cycas* species could be classified into four types according to their epidermal cells pattern and other characters of stomata apparatus. The above result indicated that leaf epidermal characters can be used for identifying extant or fossil *Cycas*

species; 2) Four leaf epidermal types were related to their natural habitats; therefore, the combination of different leaf epidermal characters may be a good indicator for palaeoenvironment; 3) Species included in this study varied in stomatal parameters despite they grew under the same cultivating environment. The variation of Stomatal Index (SI) within *Cycas* was associated with phylogeny; the SI presented with significant phylogenetic signal, whereas the phylogenetic signals of other stomatal parameters were weak. This study indicated that, when using the stomatal density/index method to reconstruct palaeo-atmospheric CO₂ concentration, it should be cautiously considered to choose nearest living species as proxies, especially these with similar morphology, habitat and close phylogenetic relationship. In addition, the relationship between stomatal parameters and CO₂ partial pressure ($p\text{CO}_2$) should be clarified within a genus so as to improve the effectiveness of this method.