

关苍术的开花动态和花蕊形态及花粉活力研究

朴 锦^{1,2}, 王 坤², 范惠明³, 王永明³

(1. 沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110000; 2. 延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002;

3. 吉林省延边长白山药业有限公司, 吉林 汪清 133200)

摘 要:以关苍术为试材,通过挂牌调查、扫描电镜观察及花粉培养等方法,研究了关苍术开花动态、花蕊形态及花粉活力。结果表明:关苍术单株花序的开放顺序是自上而下,花序为由外至内,雌花花期为12~14 d,两性花花期为14~17 d;关苍术花粉最长轴为 $57.95 \pm 2.44 \mu\text{m}$,属于大孢粉,花粉粒形态指数为1.19,属于长球形;检测花粉活力的染色法中以联苯胺-过氧化氢染色为最好,适宜的花粉培养条件为蔗糖浓度15%、培养温度25℃、培养时间4 h,此条件下花粉萌发率达80.4%。

关键词:关苍术;开花动态;花粉活力;花粉;柱头

中图分类号:S 567.239 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)12-0142-04

植物花的形态特征不仅是分类学中主要研究对象,也是自身繁育的重要器官。花的特征可分为花部构成和花的开放式样。花部构成是包括花的结构、颜色、气味、蜜汁产量等单个花的所有特征;花的开放式样是指花在某一时间开放的数量和在花序上的空间排列,可看作花在群体水平上表现出的特征^[1]。

关苍术(*Atractylodes japonica* Koidz. et Kitam)属菊科多年生草本植物,以干燥根茎入药,为吉林省的道地药材,具有燥湿健胃、祛风湿、明目等功效,能治湿困脾胃、倦怠嗜卧、胸痞腹胀、食欲不振、肢节酸痛、夜盲等疾病^[2]。关苍术主产于我国东北,近年来野生资源日趋枯竭,产量逐年锐减,而人工栽培又刚刚起步,不能满足市场需求。2005年内蒙古、辽宁、吉林、黑龙江等省区发布法规将关苍术列入本省区重点保护野生药材物种^[3]。该研究对关苍术花部形态特征进行详细观察,旨在进一步了解关苍术的生殖生物学特性,以期关苍术的可持续利用、杂交育种及资源保护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料分为野生关苍术和栽培关苍术。野外调查点设在吉林省延吉市帽儿山和龙井市智新镇长财村后山坡,每隔1 d定株观察;栽培关苍术种植在延边大学农学院实验基地。

第一作者简介:朴锦(1973-),女,博士研究生,副教授,研究方向为中药材栽培及育种。E-mail: piaojin@ybu.edu.cn.

基金项目:延边大学校级资助项目(2011800-602013127)。

收稿日期:2014-01-16

1.2 试验方法

1.2.1 开花动态研究 在关苍术蕾期至终花期间,随机选20株挂牌,每天跟踪调查开花动态,采用肉眼、放大镜、体式显微镜观察花部特征,并用相机拍摄。

1.2.2 花蕊形态观察 取新鲜花粉及柱头,直接涂于粘有双面胶带的小金属台上,用SBC-12小型离子测射仪喷金处理后,直接用日立S-3500N扫描电子显微镜观察、拍照。

1.2.3 花粉活力检测 氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法:关苍术花刚刚开放时,取少量花粉置于载玻片上,加1~2滴TTC染色液,放入40℃的恒温箱15 min后在光学显微镜下观察,有活力的花粉为红色(活力较强)和淡红色(活力较弱),无活力的花粉无色。过氧化物酶测定法:取少量花粉撒于载玻片上,加联苯胺-α萘酚1滴,放入30℃恒温箱中,10 min后在显微镜下观察,有生活力的花粉粒呈红色,无生活力花粉呈黄色或无色。醋酸洋红染色法:关苍术花刚开放时,取少量花粉放在载玻片上,加1~2滴醋酸洋红染色液,放入40℃的恒温箱中,15 min后在光学显微镜下观察,有活力的花粉为深红色,活力较弱的花粉为淡红色,没有活力的花粉为无色。

1.2.4 关苍术花粉培养研究 采用4种蔗糖浓度和3种培养温度的双因素完全随机试验设计,3次重复。在100 mL蒸馏水中,加入琼脂1 g,置于烧杯中加热煮沸,然后将烧杯置于水浴锅中,分别加入5、10、15、20 g蔗糖,溶解后搅匀备用。将不同蔗糖浓度的培养基滴在载玻片上,凝固后用发丝蘸取花粉粒,均匀播种于培养基后盖上盖玻片。将播完花粉的载玻片放在铺有湿润滤纸的培养皿中,分别在15、20、25℃的恒温保湿条件下培

养。培养 2 h 和 4 h 后,在显微镜下观察花粉萌芽率,以确定适合的培养时间。

2 结果与分析

2.1 开花动态研究

关苍术由许多管状小花构成总状花序,花序外围有一轮叶状苞片,总苞片 5~8 层,花瓣为白色,5 枚连合,子房 2 心皮下位,花柱 1 条,伸于花药管中,顶端柱头 2 裂。

关苍术两性花,雌花异株,两性花具有聚药雄蕊,开花后能看见淡紫色的花药(图 1-B2),而雌花中则看不到花药,剥除花瓣后可看到相互分离的花丝和花药,但花药全部干瘪不产花粉。关苍术不同植株单花开放进程大致相似,花蕾期为 30~40 d,雌花单花花期为 12~14 d,两性花相对较长,14~17 d。

开花前 2~3 d,总苞稍微打开,从开口处清晰看到白色小花和淡黄色冠毛;开花前 1 d,开口继续张开,同

时边缘的小花花苞渐大,此时能明显分辨即将开放的小花(图 1-A1);第 1 天,周围的小花先开放,花瓣卷曲,雌花开花时直接露出椭圆型柱头,柱头当天随即二裂(图 1-A2);第 2~4 天小花从外向内伊始盛开;第 5 天大部分雌花已完成授粉,开始枯萎(图 1-A6);到第 12 天全部小花完全凋谢,进入结实期(图 1-A8)。

两性花开花动态与雌花有些不同,第 1 天开花时,露出淡紫色花药,随着花柱快速生长柱头顶破花药,带出花粉(图 1-B1),但此时柱头还未成熟,不具有雌性功能;第 2 天,剩余的花粉继续从花药顶端溢出,花柱继续伸长,有些柱头开始二裂(图 1-B2);第 3~4 天,花序外围的小花花药开始枯萎,从淡紫色逐渐变为枯黄色,而内部仍有很多小花还未开放;第 5~6 天,内部小花全开放,第 7~9 天,内部小花的柱头也已二裂,花瓣开始枯萎(图 1-B6);第 14 天进入结实期(图 1-B8)。

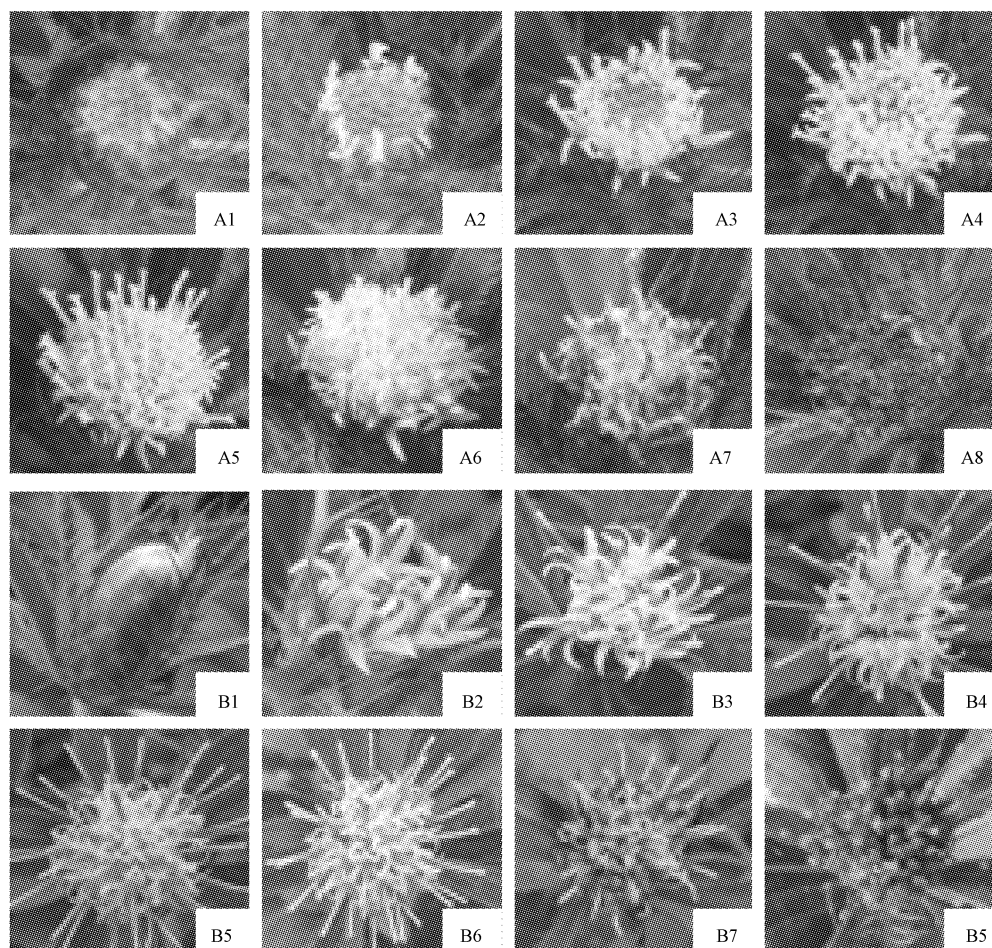


图 1 关苍术开花动态

Fig. 1 The flowering dynamic of *Atractylodes japonica*

注: A1~A8 雌花; B1~B8 为两性花; A1. 开花前 1 d; A2. 第 1 天; A3. 第 2 天; A4. 第 3 天; A5. 第 4 天; A6. 第 5~6 天; A7. 第 7~10 天; A8. 第 10~12 天; B1. 第 1 天; B2. 第 2 天; B3. 第 3 天; B4. 第 4 天; B5. 第 5~6 天; B6. 第 7~9 天; B7. 第 10~12 天; B8. 第 13~14 天。

2.2 花蕊形态观察

借助扫描电镜观察关苍术花粉形态特征的结果,关苍术花粉单花粉,花粉赤道面观呈椭圆形,极面观呈3裂圆形,具有3个浅萌发沟,萌发孔不明显。花粉外壁具刺状雕纹及小穴状网孔,刺长 $2\sim 3\ \mu\text{m}$,渐尖,刺尖端无网孔,刺中部以下、外壁表面及萌发沟里密布小穴状网孔。花粉粒平均极轴长为 $57.95\pm 2.44\ \mu\text{m}$,平均赤道轴长为 $48.70\pm 5.02\ \mu\text{m}$,形态指数(P/E)为1.19(图2 a、b、c)。在扫描电镜下,关苍术柱头椭圆型,顶端呈二裂,柱头表面由近椭圆形的上皮细胞组成,细胞中间凹陷,以增加接受花粉的面积,柱头表面未见分泌物,属于干柱头。柱头除顶端外,周围上皮细胞延伸为白色的短毛状,呈“刷粉毛”;花柱的表皮细胞呈长棒状,其长轴与花柱平行,平均长度为 $53.72\pm 3.52\ \mu\text{m}$,宽度为 $9.72\pm 0.33\ \mu\text{m}$ (图2 d、e、f)。

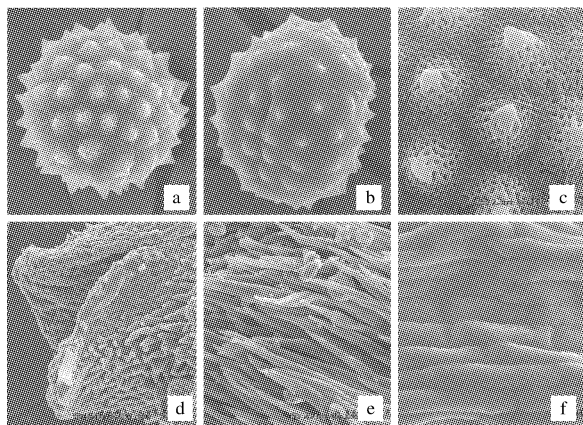


图2 关苍术花粉及柱头电镜图

Fig. 2 The electron microscope picture of pollen and stigma of *Atractylodes japonica*

注:a.花粉极面观;b.花粉赤道面观;c.花粉外壁;d.二裂柱头;e.刷粉毛;f.花柱。

2.3 关苍术花粉活力检测及培养

TTC、醋酸洋红和联苯胺-过氧化氢法对关苍术花粉活力检测结果显示,关苍术花粉未被氯化三苯基四氮唑(TTC)染色,而醋酸洋红和联苯胺-过氧化氢都可以使有活力的关苍术花粉染成深红色和红色(图3 a、b)。不同条件下关苍术花粉培养研究表明,培养4 h后花粉萌发数逐渐趋于稳定。经对稳定后的萌发率进行方差分析,在不同蔗糖浓度、培养温度及二者的互作条件下培养的花粉萌发率间均有极显著差异(表1)。由表2可知,蔗糖浓度为15%时,花粉萌发率普遍高于其它浓度,而且生长的花粉管也相对长(图3 c、d);就培养温度而言,在蔗糖浓度相同条件下25℃花粉萌发率较高于其它温度。不同蔗糖浓度和培养温度间交互作用看,蔗糖浓度为15%、培养温度为25℃时关苍术花粉萌发率最高,达80.4%,且与蔗糖浓度20%、温度25℃的花粉萌发率间无显著差异。

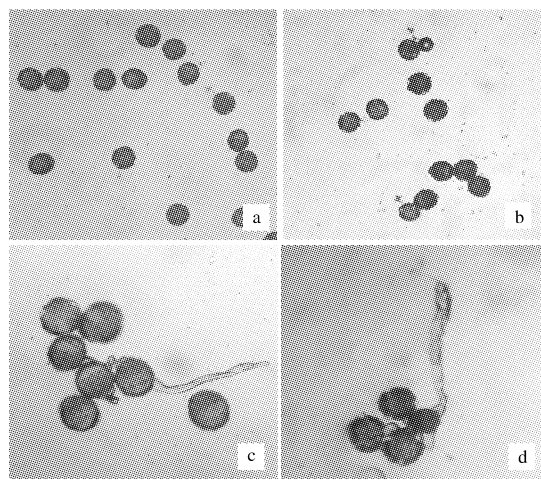


图3 花粉染色及花粉管

Fig. 3 Pollen staining and pollen tube

注:a.醋酸洋红染色(40×);b.联苯胺-过氧化氢染色(40×);c、d.花粉管生长(100×)。

表1 不同蔗糖浓度和培养温度下的花粉萌发率方差分析

Table 1 Variance analysis of different sucrose concentration and temperature on pollen germination rate

变异来源	SS	Df	MS	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
蔗糖浓度	0.3773	3	0.1258	54.70 **	3.0088	4.7181
培养温度	0.0792	2	0.0396	17.22 **	3.4028	5.6136
蔗糖浓度×培养温度	0.0659	6	0.0110	4.79 **	2.5081	3.6667
误差	0.0550	24	0.0023			
总计	0.5775	35				

表2 不同条件下的关苍术花粉萌发率

Table 2 The pollen germination rate of different conditions of *Atractylodes japonica*

蔗糖浓度	培养温度	花粉萌发率	Pollen germination rate/%
Sucrose concentration/%	Culture temperature/℃	培养2 h	培养4 h
5	15	43.9	45.9gEF
	20	38.7	42.8gF
	25	43.6	50.9efgDEF
10	15	55.8	57.6defCDE
	20	30.2	51.5efgDEF
	25	57.3	59.3deCD
15	15	49.6	71.7bcAB
	20	57.2	71.2bcAB
	25	54.7	80.4aA
20	15	33.8	49.9fgDEF
	20	61.6	65.0cdBC
	25	70.7	76.8abA

3 讨论与结论

花序的结构及其开放进程、花粉和柱头活力等植物繁育系统的特性决定着传粉和授粉等有性生殖过程,从而影响生殖效率^[4]。关苍术单株花序的开放顺序是自上而下,花序内小花的开放顺序为由外至内。单花开放时间雌花为12~14 d,而两性花比雌花花期长2~3 d;外

围小花开放到全部小花开放所需时间,雌花为 3~4 d,两性花为 5~6 d,两性花开放需要更多的时间,并且其柱头的二裂时间也比雌花晚 2~3 d,这可能与两性花比雌花多一个花药成熟的过程,从而造成整个花期的延长。

花粉是植物携带遗传信息的雄性生殖细胞,与其它组织器官相比性状更稳定,形态特征受环境因素影响较小。因此,花粉粒形状、轮廓、大小、颜色、萌发沟及纹饰等形态特征可为物种鉴别提供重要依据^[5]。关苍术花粉最长轴为 $57.95 \pm 2.44 \mu\text{m}$,据埃尔特曼的划分标准^[6],属于大孢粉;花粉粒形态指数为 1.19 (1.14~2.00),属长球形;花粉壁表面粗糙,具有刺状初级雕纹,网状次级雕纹,这些有利于花粉的固着而促进授粉。据 Walker^[7]的研究,花粉表面纹饰的演化趋势为表面光滑→表面网状、条纹状表面→疣状、刺状而言,关苍术花粉进化程度较高,形成较晚。关苍术柱头膨大成椭圆形,顶端二裂,其表皮细胞中间凹陷,中下部密布短毛等特征,不仅增加了接受花粉的面积,而且也利于推出成熟花粉及花粉的附着,从而增加授粉机率。关苍术柱头是干柱头,传粉时不产生分泌物,但柱头表面存在亲水性蛋白质薄膜,能从薄膜下角质层的中断处吸收水分。

该研究采用 3 种染色法来检测关苍术花粉活力,其中 TTC 染色未能使花粉着色,这与李林等^[8]的研究结果一致。醋酸洋红和联苯胺-过氧化氢都可以使有活力的花粉染色,而醋酸洋红不仅使有活力的花粉染成红色,而未成熟和败育的花粉也正常着色。因此,最适合检测关苍术花粉活力的方法是联苯胺-过氧化氢染色法。花粉生活力的测定方法中花粉萌发法最接近自然实际

情况,且还为以克服不亲和性为目的的试管受精和通过花粉进行基因转移等新技术研究奠定基础^[9]。关苍术花粉萌发试验表明,蔗糖浓度和培养温度之间存在交互作用,在 12 个组合中,蔗糖浓度 15%、培养温度为 25℃ 时最有利于关苍术花粉萌发,且培养 4 h 时花粉萌发率基本达到稳定。培养基的不同酸碱度^[10]、微量元素^[11]等因素对花粉萌发具有显著影响,这些因素是否对关苍术花粉萌发也有促进作用,有待今后进一步研究。

参考文献

- [1] 黄双全,郭友好. 传粉生物学的研究进展[J]. 科学通报,2000,45(3): 225.
- [2] 南京中医药大学. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:1482-1486.
- [3] 丁立威. 苍术产销分析[J]. 中国现代中药,2012,14(6):55-58.
- [4] 郝建华,钱海军,强胜,等. 加拿大一枝黄花的开花动态及柱头与花粉活力[J]. 南京农业大学学报,2010,33(6):63-67.
- [5] 谢作成,郭巧生,邵清松,等. 杭菊 5 个新栽培类型及传统型药用菊花花粉形态比较研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(21):2256-2259.
- [6] 艾尔特曼 G. 孢粉学手册[M]. 中国科学院植物研究所古植物研究室孢粉组,译. 北京:科学出版社,1969.
- [7] Walker J M. Aperture evolution in the pollen of primitive angiosperm[J]. Amer Jour Bot,1974,61(100):1112-1136.
- [8] 李林,谷巍,巢建国,等. 濒危药用植物茅苍术花粉形态、活力测定及贮存研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(11):1546-1549.
- [9] 叶要妹,张俊卫,齐迎春,等. 百日草自交系花粉萌发条件及花粉活力研究[J]. 华中农业大学学报,2007,26(5):693-697.
- [10] 许桂芳,张朝阳. 红檵木的花器构造与花粉生活力的研究[J]. 吉林农业大学学报,2003,25(5):520-522.
- [11] 艾军,王英平,李昌禹,等. 五味子的花粉形态及授粉特性研究[J]. 吉林农业大学学报,2007,29(3):293-297.

Research on Flowering Dynamic, Flower Morphology and Pollen Viability of *Atractylodes japonica*

PIAO Jin^{1,2}, WANG Kun², FAN Hui-ming³, WANG Yong-ming³

(1. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110000; 2. Agricultural College, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002; 3. Jilin Yanbian Changbai Mountain Pharmaceutical Co. Ltd, Wangqing, Jilin 133200)

Abstract: Taking *Atractylodes japonica* as material, the flowering dynamics of rhizoma *atractylodis*, flower morphology and pollen viability were studied by listing survey, scanning electron microscope and the methods of pollen culture. The results showed that the opening sequence of a single plant inflorescence of *Atractylodes japonica* was from top to bottom, inflorescence inside was from outside to inside, the florescence of female flower was 12~14 d, the florescence of bisexual flower was 14~17 d; the pollen longest axis of *Atractylodes japonica* was $57.95 \pm 2.44 \mu\text{m}$ and was the large pollen, pollen morphology index was 1.19 and was the long ball shape; Benzidine-hydrogen peroxide staining method was the best for staining of pollen viability detection. The most suitable pollen culture conditions was when sucrose concentration was 15%, culture temperature was 25℃, culture time was 4 h, the pollen germination rate of rhizoma *atractylodis* was 80.4% under this condition.

Key words: *Atractylodes japonica*; flowering dynamic; pollen viability; pollen; stigma