

青藏高原特有植物独一味 繁育系统初步研究

金 兰

(青海师范大学 生命与地理科学学院,青海 西宁 810008)

摘 要:以青海玉树独一味为试材,采用野外观测和试验测定相结合的方法,研究了独一味以开花物候、OCT、P/O、花粉活力、柱头可授性为基础的繁育系统类型。结果表明:独一味开花物候期为5—7月,OCT为4、P/O为1 645、雌雄异熟,有性繁育系统初步确定为部分自交亲和,异交,需要传粉者。

关键词:独一味;繁育系统;开花物候

中图分类号:R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)08-0145-05

独一味(*Lamiophlomis rotata* (Benth) Kudo)属唇形科中的一个单型属独一味属植物^[1],由于该物种分布面较窄,在中国主要分布于西藏、青海的玉树果洛藏区、甘肃的甘南藏区、四川西部,云南西北部呈少量的零星分布^[2],因而,有学者把它列为青藏高原特有的植物^[3]。近几年来,由于独一味产品规模化大量生产,人为的滥采滥挖等因素的影响,该物种已濒临灭绝,2000年已经将独一味列为一级濒危藏药品种^[3]。目前,许多研究人员

对独一味的研究主要集中在临床应用、成分分析等方面,对其繁育的系统研究很少,通过独一味人工繁殖的研究发现,独一味自然结实率很低,该试验以分布于青海玉树国营牧场的独一味自然居群为研究对象,初步研究了花的生物学特性、不同海拔开花物候、花粉胚珠比、杂交指数及自然结实率,旨在进一步研究独一味的繁殖特性及种子形成机制,为更好的利用和保护这一濒临灭绝的物种资源提供初步的理论参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地设在青海省玉树州玉树国营牧场中,位于北纬33°27'99",东经96°52'86",总面积为55 hm²,平均海拔4 400 m,气候为高原大陆性凉温半干旱气候,光能丰富,

作者简介:金兰(1965-),女,硕士,教授,现主要从事高原中藏药及其生理等研究工作。E-mail:qhjinlan@163.com.

基金项目:青海省科技厅资助项目(2015-Z-Y06)。

收稿日期:2015-12-16

Detection and Analysis of Physiological Indexes of *Lentinula edodes* in Liquid Fermentation Process

YIN Shuping¹, CHENG Xianli², CHEN Wenqiang³

(1. Shaanxi Pharmaceutical Holding Group Biological Products Co. Ltd., Hanzhong, Shaanxi 723000; 2. Department of Pharmaceutical and Medical Technology, Hanzhong Vocational and Technical College, Hanzhong, Shaanxi 723000; 3. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723000)

Abstract: Taking *Lentinula edodes* 66[#] as test material, using the method of liquid fermentation, the main physiological indexes (mycelial pellet numbers, pH value, reducing sugar content, amino nitrogen content, cellulase activity, laccase activity, protease activity) affecting the mycelial growth of *Lentinula edodes* was studied. The results showed that mycelial pellet numbers of *Lentinula edodes* was the most under the conditions with 26°C, 160 r/min in the rotary vibrator for 8 days. At this time, pH value of fermentation solution was 6.5, reducing sugar content was 47.12 mg/100mL, amino nitrogen content was 11.87 mg/100mL, cellulase activity was 1.25 U, laccase activity was 0.023 U, and protease activity was 0.18 U.

Keywords: *Lentinula edodes*; liquid fermentation; reducing sugar; amino nitrogen; enzyme activity

热量不足,冬长而冷,四季不分明,无绝对无霜期,年平均气温 2.9℃,极端最低气温-30℃,最高温度 30℃,水分较多,年均降水量 500 mm,独一味开花期的光周期为昼长 15 h,夜长 9 h,中午阳光最强时光照强度大于 150 000 lx。主要伴生种有匍枝委陵菜、秦艽、珠芽蓼、金露梅、银露梅、甘青瑞香、沙棘、川青锦鸡儿、禾本科及莎草科的植物等,该地区严禁外界人员进入,所有的生物都处于自然生长状态,受人为因素干扰较少。

该试验在 2012 年 5—7 月独一味开花期进行,试验地选择在国营牧场海拔 3 900~4 100 m 的 3 个不同生境的斑块样地上进行,即水分充足河滩边、灌木林下和阳光充足的干草原上进行。

1.2 试验方法

1.2.1 开花动态和花部结构的观察 2012 年,选择玉树国营牧场海拔 3 960 m 河滩边、阳光充足的开阔地带和海拔 4 120 m 山坡灌木林下的独一味样地各 1 块,对样地中所有独一味个体进行种群开花物候指数测定,每天观测 1 次。

1.2.2 杂交指数(Outcrossing index,OCI)的估算 按照 DAFNI^[4] 的标准,进行花序直径、花朵大小和开花行为的测量及繁育系统的评判。

1.2.3 花粉胚珠比(Pollen-ovule ratio,P/O)的估算 按照 CRUDEN^[5] 花粉-胚珠比估算方法来估算花粉-胚珠比,依其标准判断独一味繁育系统类型。单花花粉量估算:取 5 朵即将开放的独一味单花,剪下 4 个花药囊,放入离心管中,用解剖针撕裂独一味的花药囊,用 0.5% 亚甲基蓝溶液定容至 1 mL,盖上盖子,用力摇动,摇匀后,取适量的花粉溶液滴在血球计数板上,在显微镜下观察,统计其花粉粒数目,每朵花重复计数 6 次,求出每朵花的花粉量。胚珠数的统计:在测花粉量的同时,将每朵花的子房直接在载玻片上压开,在光学显微镜下统计其胚珠数。

1.2.4 MTT 法检测花粉活力 从花蕾期开始^[6],分别取花蕾期(0 d)、始花期(1 d)、盛花期(2~3 d)、衰退期(4~5 d)、枯萎期(6~7 d)、果熟期(8 d 以上)的花朵,将花药置于载玻片上,加 1 滴蒸馏水,用镊子捣碎,再加 1~2 滴 MTT,盖上盖玻片,置低倍显微镜下观察,活力强的花粉被染成深紫色,活力弱的染成淡紫色,没有活力的呈黄色。每个花期制作 3~5 个装片,每个装片随机选择 5 个视野,统计每个视野中染成深紫色和淡紫色的花粉占全部花粉的比例,即花粉的活力。

1.2.5 柱头可授性的测定 采用联苯胺-过氧化氢法,将花蕾期(0 d)、始花期(1 d)、盛花期(2~3 d)、衰退期

(4~5 d)、枯萎期(6~7 d)、果熟期(8 d 以上)花的柱头泡在联苯胺-过氧化氢液中,置于解剖镜下观察,若柱头具有可授性有大量气泡出现,否则无气泡产生,显微拍照^[6],气泡越多越大,活性越强。

1.2.6 结实率 在试验地的不同生长区,分别选取自然成熟的独一味花序 100 株,统计其结实率。

2 结果与分析

2.1 玉树独一味开花物候

由表 1 可以看出,独一味现蕾期为 5 月下旬,始花期是 6 月初,盛花期是 6 月中下旬,衰退期是 6 月末、7 月初,枯萎期为 7 月中旬,结果期为 7 月底、8 月初,果熟期为 9 月上旬;种群的花期长度为 44~47 d,平均开花振幅为 6~8 花数/d,平均单花花期长度为 6 d。

表 1 不同海拔独一味开花动态

观测项目	开花日期/(月-日)	
	海拔 3 960 m	海拔 4 120 m
现蕾期	05-18—05-21	05-21—05-28
始花期	05-31—06-05	06-06—06-11
盛花期	06-15—06-21	06-18—06-24
衰退期	06-27—07-03	07-04—07-10
枯萎期	07-10—07-16	01-14—07-20
结果期	07-23—07-29	07-27—08-04
果熟期	09-03—09-09	09-10—09-16
种群总花期长度/d	47±3	44±3
平均开花/(花数·d ⁻¹)	8±1	6±1
平均单花花期长度/d	6±1	6±1

2.2 玉树独一味杂交指数的估算

由表 2 可知,玉树独一味花冠直径为 5~6 mm,记为 2;玉树独一味花药散粉时其柱头不具有可授性,即独一味有雄蕊先熟现象,记为 1;玉树独一味雌雄蕊空间分离,大部分雄蕊高于雌蕊,少数雌蕊高于雄蕊,即柱头与花药空间分离,记为 1;根据 DAFNI^[4] 的标准要求,玉树独一味的杂交指数为 4,其繁育系统初步确定为部分自交亲和,异交,需要传粉者。

表 2 独一味杂交指数

项目	结果
花冠直径	2
花药开裂与柱头可授性时间分离	1
柱头与花药空间分离	1
杂交指数	4
繁育系统类型序直径	部分自交亲和,异交,需要传粉者

2.3 玉树独一味花粉-胚珠比的估算

由表 3 可知,统计的玉树独一味的花粉-胚珠比(P/O)为 1 645,按 CRUDEN 的标准,可初步确定其繁育系统为兼性异交。

表 3 独一味单花花粉量及花粉-胚珠比

观测项目	单花花粉数量	单花胚珠数	P/O 值	繁育系统类型
观测结果	≈6 580	4	1 645	兼性异交

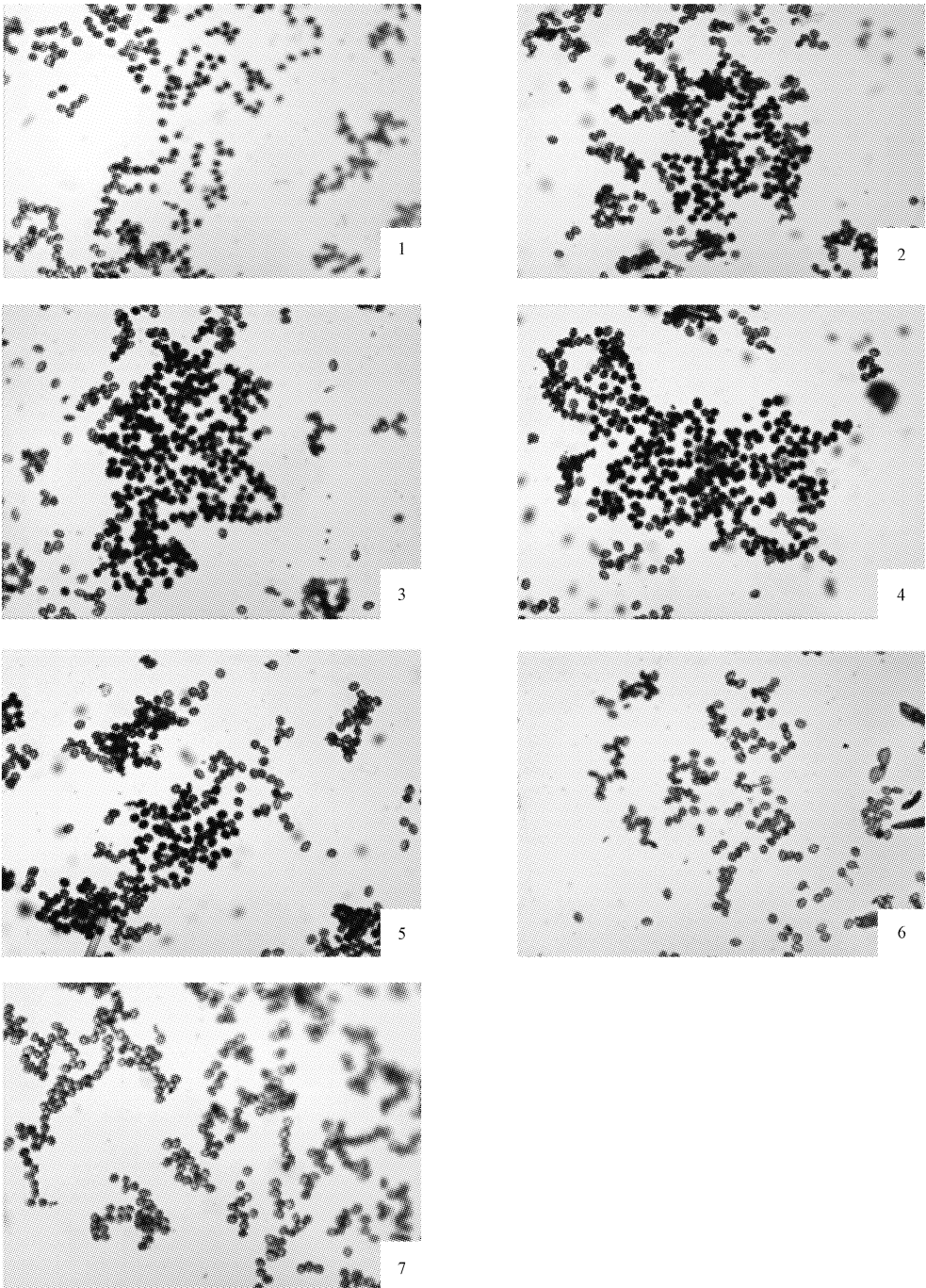
2.4 玉树独一味花粉活力测定

MTT 法测定开花不同天数的独一味花粉活力呈极显著差异($P<0.001$),由表 4、图 1 可知,独一味开花 2~3 d 时,花粉活力最强为 88%~95%,开花 1 d 和 4 d 时,活力为 50%以上,开花 5 d 时活力为 37%,花蕾期和开花 6 d

极少部分的花粉已经具备一定的活力,大部分花粉无活力。

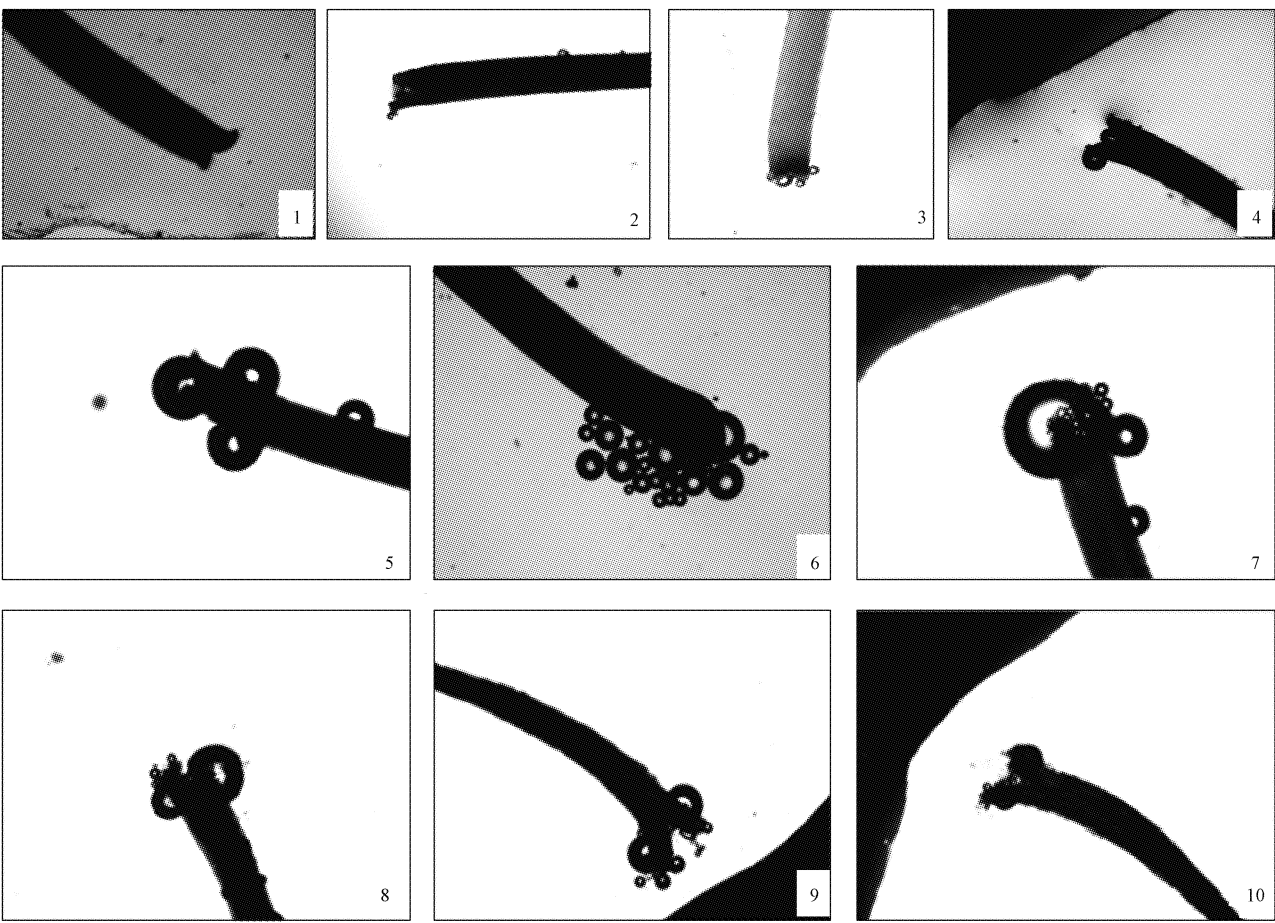
2.5 玉树独一味不同开花期柱头可授性的测定

研究发现,玉树独一味在开花 5~6 d 的柱头上产生大量的气泡,柱头可授性为最强(图 2-7),从表 5 可以看出,开花天数与柱头可授性强弱的相关性表现为:5 d>6 d>4 d>7 d>3 d>8 d>2 d>1 d>0 d,而花粉活力在 2~3 d 为最强,柱头的可授性和花粉的活力呈现完全的不同步性。



注:图 1~7 分别为开花 0、1、2、3、4、5、6 d 花粉,图中紫色为活性很强花粉,淡紫色花粉为活性微弱花粉,黄色花粉为无活性花粉。

图 1 MTT 法测定独一味花粉活力(10×10)



注:1~10 从上至下分别是花蕾期、开花 1~9 d 柱联苯胺-过氧化氢法测定柱头可授性头的活性,气泡越大活性越强。

图 2 联苯胺-过氧化氢法测定柱头可授性(10×10)

表 4 MTT 法测定独一味花粉活力

开花天数	花粉数量(花粉数·视野 ⁻¹)			花粉活力/%
	紫色	淡紫色	黄色	
蕾期(0)	12±3	72±10	203±10	29eE
1	130±10	8±1	102±10	58cC
2	179±10	2±1	14±1	95aA
3	130±10	9±1	16±1	88bB
4	52±6	18±1	73±10	56cC
5	74±7	57±10	223±10	37dD
6	32±4	49±10	278±10	22eE

表 5 不同天数的花粉活力和柱头可授性比较

开花天数/d	花粉活力/%	散粉情况	柱头的可授性
蕾期(0)	29.31	未散粉	-----
1	58.29	部分散粉	+/----
2	95.66	散粉	+/----
3	88.37	散粉	++/---
4	56.12	散粉	+++/-
5	37.10	散粉	++++
6	22.74	散粉	++++
7	13.39	散粉	+++/-
8	5.81	散粉	++/---

注:++++,柱头可授性为最强;+++/-大部分柱头有较强可授性,极小部分柱头可授性较弱;++/-,具可授性柱头和不具可授性柱头相当;+/----极:少部分柱头具可授性,大部分柱头丧失可授性;-----,所有柱头都不具可授性。

2.6 结实率

从表 6 可以看出,不同海拔的独一味自然结实率为 10%,但部分种子不饱满,饱满的可以长出幼苗的种子,只有 5%~6%。

表 6 不同海拔自然结实率

观测项目	海拔 3 960 m	海拔 4 120 m
株数/个	5	5
单花数/朵	979±10	853±10
结实率/%	10	10
饱满率/%	6	5

3 讨论

3.1 玉树独一味繁育系统的初步确立

根据 DAFNI^[4]的方法,测定的玉树独一味的 OCI 值为 4,可初步确定玉树独一味的有性繁育系统为自交亲和,有时需要传粉者;玉树独一味的花粉-胚珠比为 1 645,按 CRUDEN^[5]的标准,可初步确定其繁育系统为兼性异交。

3.2 玉树独一味传粉机制的初步研究

植物的传粉效率与该植物的花粉活性、柱头活力和传粉媒介等息息相关,对玉树国营牧场独一味花粉活性和柱头活力的研究结果显示,独一味同一朵花中的雌雄蕊成熟性存在明显的不同步性,开花 2~3 d 时,雄蕊的活力为最强,此时的柱头可授性很弱,5~6 d 柱头可授性最强时,但花粉活力只有 20%左右,这种状况会导致独一味自花授粉成功几率较为有限,也可能是导致独一味花粉在柱头上萌发较少的原因之一;研究发现,独一味的花序中的单花是逐级开放的,在一个花序中,花蕾

至花谢等各个时期的花共存,这也就意味着同一个花序中一定存在柱头和花粉同时具有较高活力的花,因此,独一味的授粉成功,更多的存在于同株异花之间,但由于独一味传粉媒介较少,传粉方式单一,同株异花之间的传粉也较少成功,这些因素可能影响到玉树独一味的结实率。

3.3 玉树独一味生殖补偿机制初探

自然界中的植物,在种子繁殖机制不太完善的情况下,为了保证该物种的生存,往往会形成一些其它的补偿机制,来满足其物种繁殖的需要。独一味尽管在有性繁殖中,形成的种子比较少,但在秋季进入休眠前,每株独一味形成休眠芽,供翌年发育,所以,玉树独一味的繁殖体系中有性繁殖和无性繁殖共同存在,在有性繁殖由于遭遇青藏高原恶劣气候、传粉媒介缺乏或植物自身传粉机制限制等的情况下发生受阻后,独一味形成了较旺盛的地下贮藏器官,来满足种群的繁殖需要,其机理需要进一步探讨。

参考文献

- [1] 杨永昌. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1991:102-103.
- [2] 郭本兆. 青海经济植物志[M]. 西宁:青海人民出版社,1987:90-93.
- [3] 李隆云,占堆,卫莹芳,等. 濒危藏药资源的保护[J]. 中国中药杂志, 2002,27(8):562.
- [4] DAFNI A. Pollination ecology [M]. New York: Oxford University Press,1992:1-57.
- [5] CRUDEN R W. Pollen ovule ratios: A conservation indicator of breeding system in flowering plants[J]. Evolution,1977,31(1):32-46.
- [6] 王兵,焦恩宁,秦星,等. 宁夏枸杞传粉生态学初步研究[J]. 西北植物学报,2010,30(1):68-77.

Preliminary Study on Breeding System of Qinghai Tibetan Plateau *Lamiophlomis rotata*

JIN Lan

(Biology and Geography Sciences College, Qinghai Normal University, Xining, Qinghai 810008)

Abstract: With *Lamiophlomis rotata* in Yushu of Qinghai as test material, using the method of field observation and experiment, the breeding system of *Lamiophlomis rotata* on flowering phenology, OCT, P/O, pollen viability stigma receptivity was studied. The results showed that the flowering phenology period was from May to July, OCI was 4, P/O was 1 645, pistil stamen dichogamy and the breeding system of *Lamiophlomis rotata* was partly self compatible, the cross pollination and pollinators.

Keywords: *Lamiophlomis rotata*; breeding system; flowering phenology