

紫丹参花粉活力和柱头可授性研究

潘琼, 陈光明*, 杨艳娟, 李宁芳, 赵光国 (云南新兴职业学院, 云南昆明 650501)

摘要 [目的]研究紫丹参花粉活力和柱头可授性。[方法]通过扫描电子显微镜观察花粉粒的形态特征,采用 TTC 染色法测定紫丹参花粉活力,并通过联苯胺+过氧化氢反应液和 3%过氧化氢测定其柱头可授性。[结果]紫丹参的花粉粒为椭圆形,具有 6 条萌发沟,表面具有网孔状雕纹;花粉活力最强的时期是散粉时期。在散粉初期,紫丹参均具有较高的柱头可授性,雄蕊开始萎蔫柱头可授性达到最强。[结论]该研究可为紫丹参的育种与扩繁提供指导。

关键词 紫丹参;花粉粒;花粉活力;柱头可授性

中图分类号 S567.5⁺3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)28-0004-02

Study on Pollen Vitality and Stigma Receptivity of *Radix Salvia Yunnanensis*

PAN Qiong, CHEN Guang-ming, YANG Yan-juan et al (Yunnan Xinxing College of Professional Technology, Kunming, Yunnan 650501)

Abstract [Objective] Pollen vitality and stigma receptivity of *Radix Salvia Yunnanensis* were studied. [Method] The pollen submicroscopic morphology of *Radix Salvia Yunnanensis* was observed with scanning electron microscopy (SEM). Pollen vitality of *Radix Salvia Yunnanensis* was evaluated by TTC. Stigma receptivity was estimated by the method of Benzidine-hydrogen peroxide and 3% hydrogen peroxide. [Result] The shape of pollen grain of *Radix Salvia Yunnanensis* was elliptic with 6 germination grooves and the surface has a mesh pattern. The period for strongest pollen vitality was pollinating period by using TTC for *Radix Salvia Yunnanensis*. The pollen receptivity of *Radix Salvia Yunnanensis* generally was higher in early pollinating period, and the stigma with the strongest pollen receptivity of period of stamens began to wilt. [Conclusion] The research can provide guidance for breeding and expanding propagation.

Key words *Radix Salvia Yunnanensis*; Pollen grain; Pollen vitality; Stigma receptivity

紫丹参作为云南省的地方习用药材,来自于唇形科鼠尾草属植物云南鼠尾草 (*Salvia yunnanensis* C.H. Wright) 干燥的根及根茎^[1]。紫丹参的分布区域为云南、贵州、四川等省^[2],与丹参的药理活性相似,在临床中作为治疗心脑血管疾病的常用药物之一^[3-4]。长期以来紫丹参主要来源于野生资源,但随着需求量的增加及自身繁殖特性的限制导致其野生资源量正在逐渐减少,目前紫丹参几乎没有人工栽培。目前,紫丹参主要是有性繁殖,无性繁殖的研究极少,进行紫丹参有性繁育系统的研究,可以为紫丹参的良种选育及有性繁殖方式应用于实际生产奠定坚实的基础。通过对紫丹参植株在不同时期的花粉活力和柱头可授性进行研究,得出紫丹参花粉活力和柱头可授性的变化规律,以确定其最佳的授粉时期,紫丹参后期的育种及扩繁工作提供一定的理论依据。

1 材料与方

1.1 材料 选取云南省曲靖市富源县墨红镇关山头村委会稻堆山村(103°58'18"E, 25°19'17"N, 海拔 2 358 m, 年平均气温 13 °C, 昼夜温差大, 全年无霜期为 230 d, 年均降雨量为 1 290 mm) 野外 3 年生以上的植株观察研究。据笔者观察,紫丹参的花期比较长可达 5 个多月,植株花序开花天数可持续 30~50 d, 单花开花天数 5~8 d, 且开花第 2 或 3 天开始散粉。

1.2 方法

1.2.1 花粉粒形态特征。采集紫丹参正在开放且花药已经成熟的新鲜花朵数朵,用卡诺固定液固定。滤纸吸干固定液,从花药内取出花粉,真空干燥、离子溅射镀金膜后于 Sigma 300 扫描电子显微镜下观察花粉粒的形态特征,并拍照、

测量直径。

1.2.2 花粉活力测定。用 TTC 法测定花粉活力^[5],紫丹参开花前在不同植株上随机选取 20 朵花标记并套袋至单花花期结束。对不同开花时期的花取花粉于洁净的载玻片上,加 1~2 滴 0.5 % TTC 溶液,搅匀后盖上盖玻片,36 °C 下水浴 30 min,置于光学显微镜下观察 5 个视野,并统计花粉粒中红色花粉粒数所占总花粉粒数的比例,重复 10 次。

1.2.3 柱头可授性测定。在开花前随机标记将要开花的花序,自开花前至花萎蔫分别取不同时期 10 朵花的雌蕊,将其浸入含有联苯胺+过氧化氢反应液(1%联苯胺:3%过氧化氢:水=4:11:22(体积比))和 3%过氧化氢的凹面载玻片中^[6]观察,根据柱头周围是否呈现蓝色、有无气泡及气泡的多少来判断柱头可授性的有无和强弱。

2 结果与分析

2.1 花粉粒的形态特征 紫丹参花粉粒为椭圆形,长 51.58~61.51 μm, 平均 57.04 μm, 宽 40.17~51.27 μm, 平均 46.45 μm, 具 6 条萌发沟(图 1), 萌发沟内能看到萌发孔,表面具网孔状雕纹。

2.2 花粉活力变化规律 由图 2 可以看出,紫丹参在开花前花粉就具有较高的活力为 55.92%;花刚开放时稍有降低,花粉活力为 46.08%,此时为紫丹参整个花期花粉活力最低值时期;花开放后花粉活力逐渐增强,至大部分花药散粉时花粉活力达整个花期最强为 90.86%;之后花粉活力逐渐减弱,但直至花冠脱落时仍有一定活力,为 46.19%。

2.3 紫丹参的柱头可授性 由图 3 可以看出,紫丹参在开花前柱头是不具有可授性的,随着花开放的程度柱头开始具有可授性并且逐渐增强,至雄蕊开始萎蔫前柱头可授性达到最强,随后逐渐减低,但直至花冠开始萎蔫并脱落时柱头仍具有可授性。

基金项目 云南省教育厅科学研究基金项目(2016ZDX280)。

作者简介 潘琼(1974—),女,云南昆明人,副教授,从事药用植物资源研究。*通讯作者,讲师,从事药用植物资源及规范化种植栽培研究。

收稿日期 2018-04-14; **修回日期** 2018-05-04

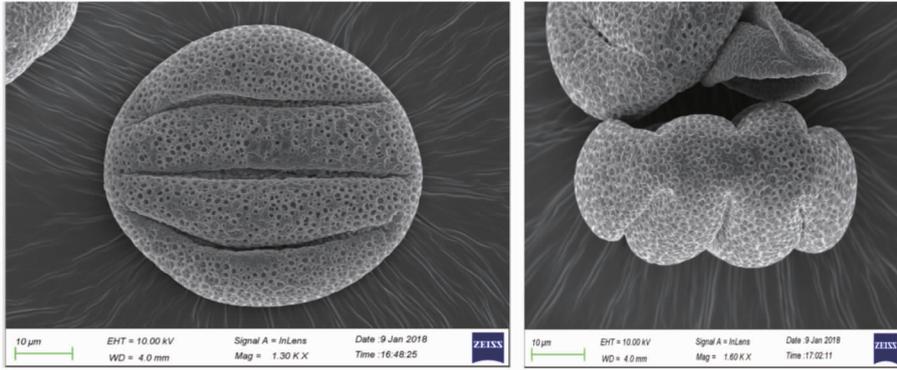
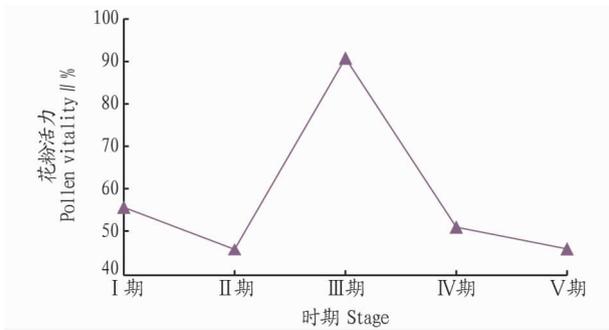


图 1 扫描电镜下的紫丹参花粉粒

Fig.1 The pollen submicroscopic morphology of Radix Salvia Yunnanensis under scanning electron microscope

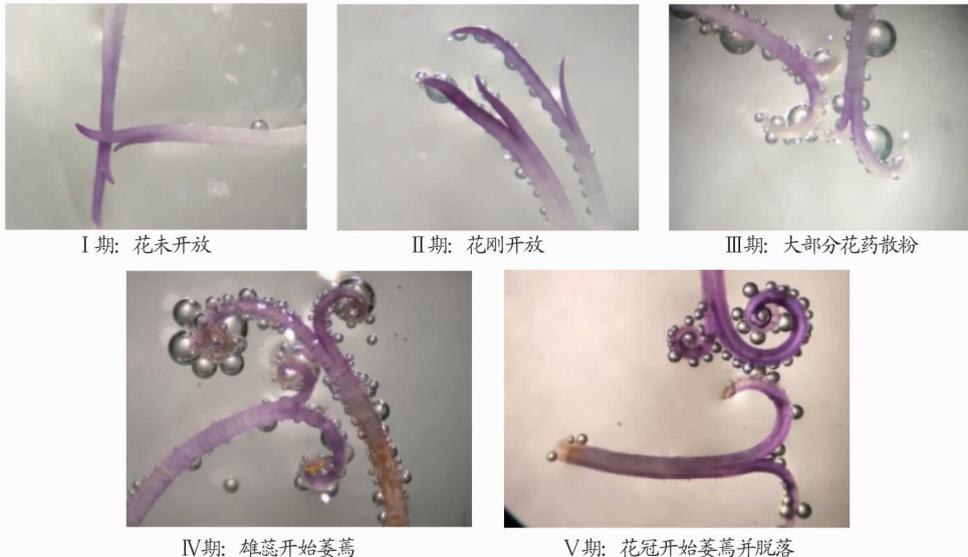


注:I 期.花未开放;II 期.花刚开放;III 期.大部分花药散粉;IV 期.雄蕊开始萎焉;V 期.花冠开始萎焉并脱落

Note:Phase I.non-opening flowers;Phase II.Flowers just open;Phase III.Most of pollen begin to loose powder;Phase IV.stamens begin to wilt; Phase V.Corolla begins to wilt and fall off

图 2 紫丹参花粉活力

Fig.2 The pollen vitality of Radix Salvia Yunnanensis



注:I 期.花未开放;II 期.花刚开放;III 期.大部分花药散粉;IV 期.雄蕊开始萎焉;V 期.花冠开始萎焉并脱落

Note:Phase I.non-opening flowers ; Phase II.Flowers just open; Phase III.Most of pollen begin to loose powder; Phase IV.stamens begin to wilt; Phase V.Corolla begins to wilt and fall off

图 3 柱头可授性判断

Fig.3 The judgment of pollen receptivity of stigma

3 结论与讨论

通过扫描电镜的观察,可以看出紫丹参的花粉粒形态为椭圆形,长为 51.58~61.51μm,宽为 40.17~51.27 μm,根据花粉粒直径大小分类,属于小型花粉,表面具网孔状雕纹符合蜂类传粉的特征^[7]。

紫丹参在花未开放时花粉开始具有活力,花粉活力在大多数花药散粉时期达到最强,后期逐渐减弱,但在花冠开始萎焉并脱落时期也具有活力,紫丹参整个花期一直具有如此强的花粉活力与其所处的野生环境息息相关。

柱头可授性作为花朵成熟过程中的一个重要时期,它能在很大程度上影响自花传粉率的高低、开花不同阶段的传粉成功率、雌性和雄性功能之间的相互干扰等^[8]。紫丹参在开花前柱头不具有可授性,随着花的开放柱头开始具有可授性并且逐渐增强,直至花冠开始萎焉并脱落时柱头仍具有可授性。

依据。

2.2.4 AFLP. 扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 是通过对基因组 DNA 的限制性酶切片段进行选择扩增而揭示其多态性,具有灵敏、稳定、多态性丰富等优点。利用 AFLP 技术在丹参^[27]、黄蘗^[28]等中药种质资源中开展了遗传多样性研究。郭庆梅等^[29]采用扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 技术对 13 个忍冬农家品种的遗传多样性进行初步分析,共获得 191 条多态性条带,表明同一道地产区的栽培品种亲缘关系较近,山东种质基于 AFLP 标记的分类结果与形态特征基本一致。

3 存在的问题与展望

我国金银花育成品种栽培历史悠久,种质资源丰富,但是金银花相对遗传基础狭窄,基础研究进展缓慢,大大制约了金银花种质资源的开发利用和保存,导致金银花品种退化、道地性差等问题。随着 DNA 分子标记技术的快速发展,近年来,国内外学者对金银花资源的收集、分类、种质评价及利用方面开展了很多研究,并取得诸多成果,使得金银花的用途更加广泛和明确。利用分子标记技术对金银花进行合理分类、发现、鉴定和利用,将会有利于挖掘和利用我国的各种金银花种质资源,提高育种效率,解决由于长期不规范的选育,金银花的种质严重退化、盲目引种等问题。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:1部[S].北京:化学工业出版社,2000:177-178.
- [2] 吴德邻.广东植物志:第4卷[M].广州:广东科技出版社,2000:291-310.
- [3] 张芳.金银花种质资源初步研究[D].济南:山东中医药大学,2005.
- [4] 周凤琴,张永清,张芳,等.山东金银花种质资源的调查研究[J].山东中医杂志,2006,25(4):268-271.
- [5] 李林,陶正明,雷海清,等.浙江产金银花的调查与评估[J].浙江农业学报,2007,19(6):431-434.
- [6] 周凤琴,李佳,冉蓉,等.我国金银花主产区种质资源调查[J].现代中药研究与实践,2010(3):21-25.
- [7] 蓝云龙,王庆霞,朱云国,等.浙江西南野生金银花种质资源的特性研究[J].中草药,2012,43(12):2490-2493.

- [8] 于燕莉,石俊英.RAPD 技术在金银花品种鉴定中的应用[J].中药材,2000,23(11):678-679.
- [9] 蒋超,袁媛,刘贵明,等.基于 EST-SSR 的金银花分子鉴别方法研究[J].药理学学报,2012(6):803-810.
- [10] 牛伟涛,曹萌.巨鹿金银花 RAPD 分子鉴别技术的研究[J].邢台学院学报,2013(2):190-192.
- [11] 徐石勇,李政静,张舒玮,等.金银花 SSR 指纹图谱的构建及遗传多样性分析[J].天津农业科学,2015,21(5):11-14.
- [12] ROOSE M L.Catalytic properties of alcohol dehydrogenase isozymes specified by duplicate genes in the diploid plant *Stephanomeria exigua*[J].Biochemical genetic,1984,22(7/8):631-643.
- [13] 肖慧,崔秀明.三七种内同工酶遗传多样性分析[J].现代中药研究与实践,2010(6):16-18.
- [14] 马永平,赵海燕,杨少娟.枸杞多种同工酶水平的遗传多样性分析[J].安徽农业科学,2010,38(8):4042-4043.
- [15] 赵永亮,张长付,覃晓娟.金银花的过氧化物酶和淀粉酶同工酶遗传多样性研究[J].安徽农业科学,2008,36(15):6225-6227.
- [16] 向增旭,郭巧生.不同金银花种源间遗传关系的 RAPD 分析[J].植物资源与环境学报,2007,16(2):57-59.
- [17] 蒋向辉,余朝文.七个不同来源金银花品种遗传多样性分析[J].南方农业学报,2011,42(8):831-834.
- [18] 赵东岳,李勇,丁万隆.我国金银花栽培品种的遗传多样性[J].世界科学技术:中医药现代化,2011,13(4):650-653.
- [19] FU J J, YANG L Q, ASADUZZAMAN KHAN M, et al. Genetic characterization and authentication of *Lonicera japonica* Thunb. By using improved RAPD analysis[J]. Molecular biology reports, 2013, 40(10): 5993-5999.
- [20] 王一斐,刘林德,葛宜和,等.胶东地区金银花品种间遗传关系的 RAPD 分析[J].安徽农业科学,2017,45(13):145-146.
- [21] 王晓明,谢碧霞,李俊彬,等.金银花 ISSR 分子标记及遗传多样性分析[J].中南林业科技大学学报,2008,28(6):14-18.
- [22] 王珊.利用 ISSR 标记技术分析灰毡毛忍冬种质遗传多样性[D].长沙:湖南中医药大学,2009.
- [23] 康玉秋.鸡爪花品系金银花的 ISSR 遗传多样性和 HPLC 指纹图谱的研究[D].济南:山东中医药大学,2012.
- [24] 王湘莹,何钢,王晓明,等.金银花不同品种间遗传变异的 ISSR 分析[J].中南林业科技大学学报,2013,33(11):77-82.
- [25] 韩琳娜,康玉秋,郭庆梅,等.道地产区金银花的 ISSR 遗传多样性分析[J].四川农业大学学报,2013,31(4):414-418.
- [26] 孙雅颖,姚辉,王振中,等.金银花种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J].世界科学技术-中医药现代化,2013(9):1890-1895.
- [27] 温春秀,吴志明,田伟,等.丹参种质资源遗传多样性的 AFLP 分析[J].华北农学报,2007,22(S2):122-125.
- [28] 闫志峰,张本刚,张昭,等.珍稀濒危药用植物黄蘗野生种群遗传多样性的 AFLP 分析[J].生物多样性,2006,14(6):488-497.
- [29] 郭庆梅,王婷,周凤琴,等.忍冬种质资源遗传多样性的 AFLP 分析[J].中国中药杂志,2012,37(20):3024-3028.

(上接第5页)

综上所述,大多数花药散粉时期是紫丹参授粉的最佳时期。这一时期,不仅花粉活力高,且柱头具有较强的可授性。

自然界中大多数植物的花粉活力和柱头可授性多保持在几天至十几天,紫丹参与普通的植物相比,其花粉活力和柱头可授性保持的时间相对较长,可达几个月之久,这是由于其生态环境所限制的。紫丹参生长的环境为高原草坡,处在高山地区的植物为了适应严酷的环境条件必须采取一定的生殖策略来应对其严酷的生长季节^[9-10],紫丹参在适生环境下,盛花期正处于其生境地高温、少雨、干旱时期,这一时期传粉昆虫因气候的原因也较少,对于这样的情况紫丹参选择通过较长的花粉活力和柱头可授性的持续时间来完成传粉,这对具有性生殖的顺利进行及种群的延续具有重要的意义。

参考文献

- [1] 云南省食品药品监督管理局.云南省中药材标准[M].昆明:云南美术

出版社,2005:45.

- [2] 钱子刚,梁晓原,侯安国,等.滇丹参药用植物资源[J].中药材,2002,25(9):628-629.
- [3] 张正付,陈鸿珊,李健蕊,等.滇丹参中酚酸类化学成分研究[J].中国中药杂志,2007,32(18):1886-1890.
- [4] 闫彩珍,李惠兰,张荣平,等.滇丹参、甘西鼠尾、褐毛甘西鼠尾对离体豚鼠心脏的影响[J].昆明医学院学报,2002,23(1):14-17.
- [5] 张荻.长白鸢尾生殖生物学研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2007:1-53.
- [6] ECOLOGY D A A practical approach[M].Oxford:Oxford University Press,1992:1-57.
- [7] 张大勇.植物生活史进化与繁殖生态学[M].北京:科学出版社,2004:302-321.
- [8] 赵金花,李青丰,那仁图雅,等.3种野生忍属植物花粉活力和柱头可授性研究[J].草业科学,2010,27(4):93-96.
- [9] HEDBERG O. Adaptive evolution in a tropical alpine environment[M]// HEYWOOD V H. Taxonomy and ecology. London: Academic Press, 1975: 71-93.
- [10] HÜLBER K, WINKLER M, GRABHER G. Intra-seasonal climate and habitat-specific variability controls the flowering phenology of high alpine plant species[J]. Functional ecology, 2010, 24(2): 245-252.