

黄芩花粉活力及柱头可授性分析

彭亮, 安衍茹, 黄涛, 张岗, 胡本祥, 王媛媛, 赵婷, 颜永刚*, 杨冰月*
(陕西中医药大学药学院, 西安 712046)

[摘要] 目的:研究黄芩的花粉活力和柱头可授性,为其人工杂交育种积累资料。方法:采用碘-碘化钾(I₂-KI)法,运用2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)法测定黄芩花粉活力;采用I₂-KI法测定不同贮藏方式、贮藏温度及时间对黄芩花粉活力的影响;采用联苯胺-过氧化氢法测定黄芩柱头可授性。结果:I₂-KI,TTC法对黄芩花粉活力的检测效果一致,其花粉活力随散粉时间延长的变化情况为先升高后降低;开花后第4天的黄芩花粉活力达到最高值,1 d当中8:00~18:00的花粉活力均超过62%,12:00左右花粉活力最强,为86.58%;花粉活力随贮藏时间的延长而呈现出下降趋势,因贮藏方法(干法和湿法)不同存在差异;黄芩柱头的增长速率于开花后第5天趋于稳定,第6天可授性最强。结论:黄芩人工授粉的最佳时期是开花后5~7 d,可以采集开花后第4天的花粉对开花后第5~7天的柱头进行人工授粉杂交。

[关键词] 黄芩;花粉活力;柱头可授性;清热燥湿;泻火解毒

[中图分类号] R931.3;R282;241;R243 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)13-0037-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181045

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180313.1013.003.html>

[网络出版时间] 2018-03-13 16:46

Pollen Viability and Stigma Receptivity of *Scutellaria baicalensis*

PENG Liang, AN Yan-ru, HUANG Tao, ZHANG Gang, HU Ben-xiang,
WANG Yuan-yuan, ZHAO Ting, YAN Yong-gang*, YANG Bing-yue*

(College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To provide theoretical basis for artificial cross breeding of *Scutellaria baicalensis* by studying the characteristics of stigma receptivity as well as the viability and life-span of pollen. **Method:** The pollen viability of *S. baicalensis* was measured by 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) and iodine-potassium iodide (I₂-KI) tests, and the pollen viability under different storage methods, temperatures and duration were detected by I₂-KI test. Furthermore, the stigma receptivity was detected by benzidine-H₂O₂ method. **Result:** TTC and I₂-KI showed the same effectiveness in the detection of pollen viability. The pollen viability of *S. baicalensis* demonstrated increase first and then decrease with the increase of blooming time. The highest pollen viability was at day 4 after blooming. Among 8:00 to 18:00, pollen viability was over 62%; and at about 12:00, pollen viability was highest (86.58%). The pollen viability was decreased with the extension of storage time, with difference between different storage methods (dry method and wet method). The growth rate of stigma tended to be stable at day 5 after blooming, and the stigma receptivity was strongest at day 6. **Conclusion:** The best time of artificial pollination of *S. baicalensis* is day 5-7 after blooming, and the pollen at day 4 after blooming could be used to pollinate the stigma at day 5-7 after blooming.

[收稿日期] 20171119(007)

[基金项目] 陕西省科技厅科技统筹项目(S2016TDSF0023)

[第一作者] 彭亮,博士,讲师,从事中药资源评价与开发利用、中药材质量控制研究,Tel:029-38185186,E-mail:ppengliang@126.com

[通信作者] *颜永刚,博士,教授,从事中药质量控制标准研究,E-mail:2252711918@qq.com;

*杨冰月,博士,讲师,从事中药品种、质量及资源开发研究,E-mail:304951774@qq.com

[Key words] *Scutellaria baicalensis*; pollen viability; stigma receptivity; heat-clearing and damp-drying; purging internal heat and removing toxin

传粉是种子植物有性生殖过程的必经阶段,为成熟花粉从开裂的花药中散出后,借助一定的媒介力量传送到适宜的柱头表面。该过程中,花粉活力与寿命、柱头可授性是影响传粉成功与否的关键因素^[1]。对药用植物的花粉活力与柱头可授性进行研究,可为其人工杂交育种提供重要的实践基础和理论指导,已引起不少学者的关注,并在白芷^[2]、重楼^[3]、三七^[4]、丹参^[5]、青蒿^[6]等药用植物花粉活力和柱头可授性方面取得了一定的研究成果。

黄芩为唇形科植物黄芩的干燥根,属我国常用大宗中药材品种之一,具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎等功效。黄芩中主要活性成分为黄酮类化合物,具有抑菌、抗肿瘤、镇静等作用,广泛分布于我国河北、山西、内蒙古、山东、河南、陕西、甘肃、山西、四川等地^[7]。近年来,随着市场需求量的不断增加,栽培黄芩已成为主要商品来源,对其进行大规模人工培育将是一种趋势^[8]。目前,对黄芩的研究主要集中在药理、化学成分等方面^[9],尚未见有关黄芩花粉活力及柱头可授性的报道。基于此,本文以黄芩为研究材料,对其花粉活力、花粉贮藏方法、贮藏温度和时间以及柱头可授性进行研究,以期为黄芩开展有性杂交、制定有效育种方案和良种培育等工作提供理论依据。

1 材料

试验于 2017 年 8 月(黄芩花期内)在陕西中医药大学药用植物园进行,试验材料根据各个研究项目要求定期采集,由陕西中医药大学中药鉴定学教研室胡本祥教授鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis*。

氯化三苯基四氮唑溶液,碘-碘化钾溶液(I₂-KI),联苯胺-过氧化氢溶液,过氧化氢溶液均为分析纯,购自西安永屹生物技术有限公司;纯净水(娃哈哈)。

ECLIPSE E100 型生物电子显微镜(南京尼康江南光学仪器有限公司);YC-300L 型 4 ℃ 冰箱,DW-YL270 型 -20 ℃ 冰箱,DW-GL100 型 -80 ℃ 冰箱(中科美菱低温科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 开花动态观察 选取生长旺盛黄芩植株的花 20 朵作为标记,从花蕾期开始进行观察,每天观察 2 次,直到花朵完全开放时为止。每次观察时做好花

的开放状态、开放过程和雌雄蕊变化等记录。

2.2 花粉活力的测定 于花期的晴天进行试验,选择长势整齐,花势相近的黄芩植株进行标记。通过前期观察,于试验开始当天 9:00 ~ 10:00 采集开花前 1 d 的黄芩花蕾 20 朵,随后每天 9:00 ~ 10:00 采集黄芩开放花 20 朵,连续 11 d,用毛笔将花粉刷落至白纸板上收集于离心管中备用。

2.2.1 不同开花天数花粉活力的测定 参照邵青松等^[10]研究花粉活力方法,采用 I₂-KI 法,2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)法测定黄芩花粉活力,比较 2 种不同染色法对黄芩花粉的染色率。将收集好的花粉撒于载玻片上,分别用 I₂-KI 法,TTC 法进行染色。每样品做 3 个玻片重复,每重复观察 5 个视野,计数染色和未染色花粉粒数,计算花粉的染色率,以染色率表示花粉的活力比率。

$$\text{染色率} = \frac{\text{被染色的花粉粒数}}{\text{视野中花粉粒总数}} \times 100\%$$

2.2.2 同 1 天不同时间段花粉活力的测定 从上午 8:00 开始,至下午 18:00,每隔 2 h 采集第 4 天开花的花粉,采用 I₂-KI 法测定花粉活力,并统计其染色率。

2.3 不同贮藏方法、温度及时间花粉活力的测定 于盛花期采集已完全开放的新鲜黄芩花朵,进行湿存和干存。采集的新鲜花朵(湿存)和硅胶干燥处理后的花朵(干存)各分成 4 等份,分装于培养皿中,随后将上述 2 种处理后的花粉分别置于室温 25 ~ 30,4, -20, -80 ℃ 条件下贮藏,分别贮藏 2,4,8,24,48,72 h 后测定花粉活力。

2.4 柱头可授性检测 采用联苯胺-过氧化氢法测定柱头活力^[11]。具体方法为于黄芩开花前进行去雄处理,采集开花前 1 d 至开花后第 10 天的花朵,取其柱头,随后完全浸泡在含联苯胺-过氧化氢反应液(1% 联苯胺-3% 过氧化氢-蒸馏水的体积比例为 4:11:22)的凹面载玻片凹陷处,每次取 20 朵去雄花朵,重复 3 次,用 4 × 10 双目显微镜观察柱头的反应情况。

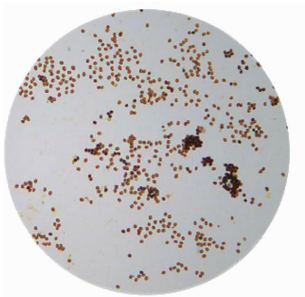
2.5 数据处理 采用 Excel 2007 和 SPSS 20.0 软件对花粉活力、柱头可授性所获得数据进行处理分析。

3 结果与分析

3.1 开花生物学特性 观测结果表明,黄芩花序于

茎及枝上顶生,总状,长 7~15 cm,常再于茎顶聚成圆锥花序;花梗长 3 mm,苞片长 4~11 mm,近于无毛;花萼开花时长 4 mm,盾片高 1.5 mm。花冠紫、紫红至蓝色,长 2.3~3 cm;冠筒近基部明显膝曲,中部径 1.5 mm,至喉部宽达 6 mm。雄蕊 4,稍露出,前对较长,后对较短;花丝扁平;花柱细长;子房褐色。研究地区的黄芩花期为 7 月上旬到 8 月下旬,花的开放顺序由下而上,开花容易受温度和湿度的影响,晴天花开数较多,雨天和阴天花开数较少。

3.2 开花时间对黄芩花粉活力的影响 考察了 I₂-KI 法和 TTC 法测定黄芩花粉活力的特性,结果表明 2 种方法检测结果一致(花粉粒被染成红色表明其具有较强活力,淡红色次之,未染色或者无变化则说明其不具有活力)。通过对开花前 1 d 至开花第 10 天的花粉活力进行测定,显示不同开花时间黄芩花粉活力差异显著,呈现出先上升后下降的趋势。开花前 1 d 到开花第 4 天,随着时间的延长,其花粉活力逐渐增强,第 4 天活力达到最大值,为 74.87%;第 5 天花粉活力下降明显,从第 6 天开始,其花粉活力下降速度逐渐减弱,到第 10 天仍然具有 13.81% 的活力。见图 1,2。



染成红色的花粉活力强,淡红次之,无色的为没有活力或为不育花粉
图 1 黄芩花粉染色状态(显微镜,×40)

Fig. 1 Fresh *Scutellaria baicalensis* pollen staining(×40)

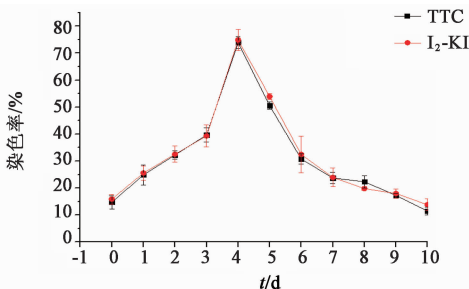


图 2 黄芩不同开花时间的花粉活力($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Pollen viability of *Scutellaria baicalensis* in different periods ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.3 黄芩花粉活力日变化情况 在 3.1 项结果的基础上,选择开花第 4 天进行花粉活力日变化的考

察。结果表明 8:00-18:00 的黄芩花粉活力变化情况为随时间变化呈先上升后下降的单峰状趋势,12:00 左右活力最强,为 86.58%;18:00 时活力最低,为 62.87%。见图 3。

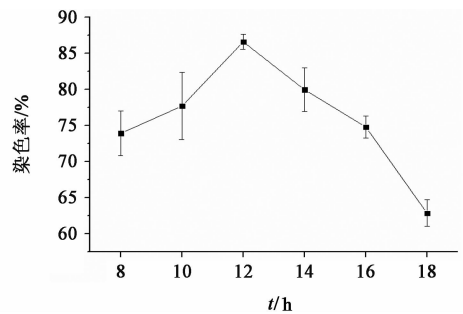


图 3 黄芩花粉活力日变化情况($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Pollen viability of *Scutellaria baicalensis* at different hours in one day($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.4 花粉贮藏特性研究

3.4.1 不同贮藏条件下湿法保存花粉活力变化 贮藏温度与贮藏时间对湿法保存的黄芩花粉活力存在显著的影响。结果显示,随着贮藏时间的延长,花粉活力降低,前 24 h 降低幅度最大,室温(25~30℃),4,-20,-80℃下花粉活力降低率均超过 50%;后期降低速率减小,72 h 后 4℃条件下花粉活力最强,为 22.68%;-80℃条件下花粉活力最弱,仅有 11.89%。见图 4。

3.4.2 不同贮藏条件下干法保存花粉活力变化情况 贮藏温度与贮藏时间对干法保存的黄芩花粉活力影响表明,随着贮藏时间的延长,花粉活力降低,和湿法保存结果一致,前 24 h 降低幅度最大,室温(25~30℃),4,-20,-80℃下花粉活力降低率均超过 50%,其中-80℃直接由 2 h 的 65.68%降低到 24 h 的 16.82%;后期降低速率减小,72 h 后 4℃条件下花粉活力最强,为 13.90%;-20℃条件下花粉活力最弱,仅有 5.90%。见图 4。

3.5 柱头可授性 黄芩花柱和柱头的长度随开花时间延长而变长,均在开花后第 4 天达到相对稳定。采用联苯胺-过氧化氢法测定黄芩柱头可授性,结果显示黄芩柱头可授性随着时间的延长呈现出先增强后减弱的趋势,开花前 1 d 柱头不具活力,开花第 1 天花柱伸长,部分柱头逐渐具有活力,但可授性较弱;第 2 天开始,柱头活力不断增强,至开花第 6 天,柱头活力达到最佳,可授性最高;随后柱头活力开始减弱,至开花第 10 天,柱头不具可授性。由此可知,黄芩在开花第 6 天柱头活力最强,具有最高的可授性,当天授粉结实率最

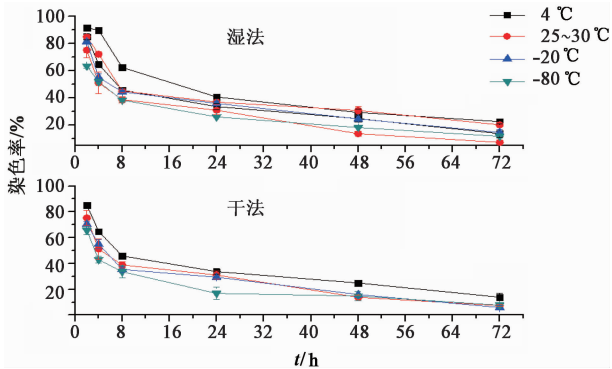


图 4 不同贮藏条件下湿法和干法保存花粉活力变化情况 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Pollen viability of *Scutellaria baicalensis* in different storage conditions ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

高。见图 5, 表 1。

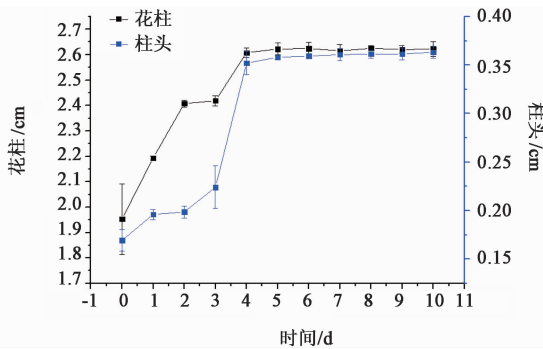


图 5 黄芩不同时期的花柱长度和柱头长度 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 5 Stylus length and stigma length of *Scutellaria baicalensis* in different periods ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

表 1 黄芩柱头可授性评价

Table 1 Stigma receptivity of *Scutellaria baicalensis*

| 开花后的天数/d | 反应情况 | 柱头可授性评价 |
|----------|--------|---------|
| 0 | 不产生气泡 | - |
| 1 | 产生少量气泡 | + / - |
| 2 | 产生少量气泡 | + |
| 3 | 产生少量气泡 | + |
| 4 | 产生少量气泡 | ++ |
| 5 | 产生中量气泡 | +++ |
| 6 | 产生大量气泡 | ++++ |
| 7 | 产生中量气泡 | +++ |
| 8 | 产生少量气泡 | ++ |
| 9 | 产生少量气泡 | + |
| 10 | 产生少量气泡 | - |

注: +. 柱头具可授性; ++. 柱头可授性强; +++. 柱头可授性极强; ++++. 柱头可授性最强; + / -. 部分柱头具可授性, 部分不具可授性; -. 柱头不具可授性。

4 结论与讨论

花粉活力是影响植物授粉、受精以及结实的决

定因子^[11]。测定植物花粉活力的方法有很多, 其中 I₂-KI 法和 TTC 法是 2 种较为常用的方法, 但存在测定误差。因此, 本研究首先考察了 I₂-KI 法和 TTC 法对黄芩花粉活力的测定特性, 结果表明 I₂-KI 法和 TTC 法均能快速检测黄芩的花粉活力, 二者效果一致。花粉保持生活力时间的长短, 一方面由遗传决定, 不同的植物花粉活力和维持时间差异显著, 如海枣^[12]的花粉寿命可长达 1 年, 鸢尾^[13]、铁皮石斛^[14]等的花粉寿命只有几天; 一方面由环境决定, 如不同桂花品种花粉活力差异显著, 低温贮藏可延长其花粉寿命^[15]。本研究结果显示, 黄芩在开花前 1 d 花粉就具有一定的活力, 表现出先上升后降低的趋势, 随着雄蕊的发育花粉活力开始上升, 第 4 天花粉活力最强, 随后其活力下降; 在一天中, 黄芩的花粉活力也表现出先上升后下降的趋势, 12:00 左右花粉活力最强。贮藏方法、温度和时间对黄芩花粉活力存在显著的影响, 随着贮藏时间的延长, 2 种方法不同温度下贮藏的花粉活力均呈下降趋势, 4 °C 贮藏可适当延长花粉活力, -80 °C 贮藏条件下的黄芩花粉活力最差。同等条件下湿法贮藏的花粉活力高于干法贮藏的花粉活力, 但 2 种贮藏方法在不同贮藏条件下贮藏 72 h 后花粉活力均低于 30%。因此, 人工授粉育种时黄芩花粉贮藏时间不宜过长, 这对黄芩授粉的成功性具有重要意义。

柱头可授期是植物花朵成熟过程中的重要时期, 是人工辅助育种中授粉时间选择的重要参考依据, 柱头的发育及可授能力会制约植物本身的自花传粉率、开花过程不同时间段的传粉率、雄花和雌花的相互作用以及配子体选择的机会等^[16]。柱头可授性因植物种类不同而呈现差异性, 可授时间从几小时至十几天不等, 花期长短、开花天数等均可影响其可授性, 如桔梗^[17]柱头可授期约为 9 d, 但其最佳授粉期为花开放后的第 4~6 天; 北重楼柱头可授性会随着散粉时间而变化^[18]。研究表明, 黄芩柱头可授性呈先上升后下降的趋势, 于开花第 1 天就具有可授性, 第 6 天可授性达到最强, 随后不断降低, 开花第 10 天不具可授性, 可知黄芩最佳授粉时期宜选择开花第 5~7 天。

综上所述, 花粉活力的强弱与柱头可授期长短很大程度会影响授粉成功率, 同时也会影响其结实率。利用黄芩花粉活力变化和柱头可授性特点, 采集黄芩花开放后第 4 天的花粉对花开放后第 5~7 天的柱头进行人工辅助授粉处理, 将有利于提高黄芩人工授粉的成功率。本研究结论对于黄芩的人工

授粉与杂交种质创制具有重要的理论价值与现实意义。

[参考文献]

[1] 苏芸芸,王康才,薛启. 不同产地藿香花粉活力与柱头可授性研究[J]. 草业学报, 2016, 25(9): 189-196.

[2] 陈郡雯,吴卫,侯凯,等. 川白芷与祁白芷花粉活力及柱头可授性测定[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(22): 3079-3082.

[3] 丁春邦,李强,李燕,等. 重楼属9种5变种花粉活力与柱头可授性特性研究[J]. 草业学报, 2009, 18(4): 61-66.

[4] 孙玉琴,周世良,陈中坚,等. 三七花粉活力和柱头可授性研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(7): 913-915.

[5] 钟国成,张利,杨瑞武,等. 丹参及其近缘种花粉活力与柱头可授性研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(6): 686-689.

[6] 王卫,杨水平,崔广林,等. 青蒿花粉活力及柱头可授性研究[J]. 西南大学学报:自然科学版, 2015, 37(2): 1-7.

[7] 徐丹洋,陈佩东,张丽,等. 黄芩的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 78-80.

[8] 张琳琳. 黄芩属药用植物资源适宜性评价及基因组大小测定[D]. 西安:陕西师范大学, 2014.

[9] 郑勇凤,王佳婧,傅超美,等. 黄芩的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中成药, 2016, 38(1):

141-147.

[10] 邵清松,王勇,胡润淮,等. 金线莲基原植物花粉活力和柱头可授性及结实特征研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(6): 1061-1065.

[11] Petanidou T, Ellis-Adam A C, den Nijs H C M, et al. Differential pollination success in the course of individual flower development and flowering time in *Gentiana pneumonanthe* L. (Gentianaceae) [J]. Bot J Linn Soc, 2001, 135(1): 25-33.

[12] 胡适宜,被子植物生殖生物学[M]. 北京:高等教育出版社, 2005: 143-147.

[13] 贾文庆,尤扬,刘会超,等. 鸢尾花粉生活力测定及贮藏特性研究[J]. 西北农业学报, 2012, 21(8): 182-185.

[14] 朱波,苑鹤,俞巧仙,等. 铁皮石斛花粉活力与种质创制研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 755-757.

[15] 张洪伟,段一凡,李稚,等. 不同贮藏方法对桂花花粉活力影响的研究[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2014, 38(S1): 7-12.

[16] 韩玉娜,梁冬,申玉贤,等. 3个苜蓿材料花粉活力和柱头可授性比较[J]. 中国草地学报, 2016, 38(5): 8-12.

[17] 魏建和,黄璐琦. 桔梗柱头、花粉活力及自交亲和性研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(5): 366-368.

[18] 崔大练,满秀玲,马玉心,等. 北重楼传粉生态学研究[J]. 西北植物学报, 2008, 28(2): 298-302.

[责任编辑 全燕]