

## 远志花粉活力与柱头可授性分析

安衍茹, 彭亮\*, 孙涛, 王媛媛, 黄涛, 赵婷, 张梅娟, 张鸿琳, 胡本祥\*  
(陕西中医药大学, 咸阳 712046)

**[摘要]** **目的:**研究远志花粉活力和柱头可授性, 以期为远志的有性繁殖和杂交育种工作研究提供科学依据。**方法:**用 I<sub>2</sub>-KI 法, 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)法测定不同开花天数(开花前一天、第1天、第2天、第3天、第4天、第5天、第6天、第7天、第8天)的远志花粉活力变化, 并比较2种染色方法对远志花粉活力的染色效果。用 I<sub>2</sub>-KI 法分别测定1 d 中不同时间段的远志花粉活力、不同贮藏方法(湿法保存的花朵和干法保存的花朵)的远志花粉活力及不同贮藏条件(4, 26, -20, -80 °C)条件下贮藏不同时间(2, 4, 8, 24, 48, 72 h)远志花粉活力。用联苯胺-过氧化氢法测定其柱头可授性。**结果:**①远志的花粉活力随着散粉时间的延长而逐渐降低, 在开花后第4天花粉活力最高;②在一天8:00~18:00中, 10:00~16:00的花粉活力较强;③干燥花粉在-20 °C贮藏的条件下能延长花粉的贮藏时间;④开花后第5天柱头可授性最强。**结论:**可以采集花后第4天的花粉对花后第5天的柱头进行人工授粉杂交, 为远志良种选育提供理论依据。

**[关键词]** 远志; 花粉活力; 柱头可授性

**[中图分类号]** R282.5; R284.1; R289; R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)17-0042-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181712

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180615.1310.003.html>

**[网络出版时间]** 2018-06-15 16:14

## Pollen Viability and Stigma Receptivity of *Polygala tenuifolia*

AN Yan-ru, PENG Liang\*, SUN Tao, WANG Yuan-yuan, HUANG Tao, ZHAO Ting,  
ZHANG Mei-juan, ZHANG Hong-lin, HU Ben-xiang\*  
(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the pollen viability and stigma receptivity of *Polygala tenuifolia*, so as to provide a scientific basis for sexual reproduction and breeding of new varieties. **Method:** The pollen viability of different blooming days (the day before flowering, day 1, day 2, day 3, day 4, day 5, day 6, day 7, day 8) were determined by the I<sub>2</sub>-KI method and the TTC method, and the staining effect of the two staining methods on pollen viability were compared. I<sub>2</sub>-KI method was used to determine the pollen activity of *Polygala tenuifolia* pollens in different periods of time, different storage methods (wet preserved flowers and dry preserved flowers) and different storage conditions (4, 26, -20, -80 °C) in different periods of time (2, 4, 8, 24, 48, 72 h). And its stigma receptivity was estimated by the benzidine-hydrogen peroxide. **Result:** ① The pollen viability of *P. tenuifolia* decreased with the rise in the powder losing time, the highest pollen viability was observed on the 4<sup>th</sup> day after flowering; ② from 8:00 to 18:00 during the daytime, the pollen viability between 10:00 and 16:00 was stronger; ③ dry pollen can prolong the storage time under the condition of -20 °C; ④ at the 5<sup>th</sup> day after flowering, the stigma receptivity was the strongest. **Conclusion:** Pollen on the 4<sup>th</sup> day after

**[收稿日期]** 20171030(022)

**[基金项目]** 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-QIN-36;202410001);公益性中医药行业科研专项(201507002-1-08)

**[第一作者]** 安衍茹,在读硕士,从事中药质量控制标准研究,E-mail:735771879@qq.com

**[通信作者]** \*胡本祥,硕士生导师,教授,从事中药质量控制标准研究,E-mail:hbx800823@126.com;

\*彭亮,博士,从事中药资源与评价与中药材质量控制标准研究,E-mail:ppengliang@126.com

flowering can be collected, and artificial pollination can be adopted for stigma on the 5<sup>th</sup> day after flowering stigma artificial pollination, so as to provide a theoretical basis for breeding of *P. tenuifolia*.

[Key words] *Polygala tenuifolia*; pollen viability; stigma receptivity

远志为远志科植物远志或卵叶远志的干燥根。春、秋二季采挖,除去须根及泥沙,晒干。性温,味苦、辛,具有安神益智、祛痰、消肿的功能,用于心肾不交引起的失眠多梦、健忘惊悸,神志恍惚,咳痰不爽,疮疡肿毒,乳房肿痛<sup>[1]</sup>。其用药历史悠久,最早记载于《神农本草经》,列为上品<sup>[2]</sup>。其为大宗中药材,且人工栽培历史较短。远志在野生状态和栽培生产过程中,容易造成远志品种退化,产量和品质明显降低,使种植远志的经济效益降低,同时也使远志的栽培推广受到限制。

目前,对远志的研究主要集中在化学成分<sup>[3-4]</sup>、药理作用<sup>[5]</sup>、代谢组学<sup>[6]</sup>、转录组学<sup>[7]</sup>等方面,尚无对远志花粉活力和柱头可授性研究的报道,本文以远志的花为研究材料,通过对其花粉活力、同一天不同时间段花粉活力、不同贮藏方法下花粉活力及其不同开花天数柱头可授性的研究,确定采集花粉活力最强和柱头授性最强的最佳时期,为远志的人工授粉、有性繁殖和育种研究奠定基础。

## 1 材料

研究材料采自陕西中医药大学药用植物园,经陕西中医药大学中药鉴定学教研室胡本祥教授鉴定为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* 的花粉。从远志开花前一天到开花第8天,根据各个研究项目要求定期采集材料。

## 2 方法

**2.1 开花动态观察** 选取生长旺盛远志植株的花10朵作为标记,从现蕾期开始进行观察,每天观察1次,直到花朵开放时为止。每次观察时做好花的开放状态、开放过程和雌雄蕊变化的记录等。

**2.2 花粉活力的测定** 参照邵清松等<sup>[8-11]</sup>研究花粉活力方法,采用 I<sub>2</sub>-KI 法,2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)法测定远志花粉活力,比较两种不同染色法对远志花粉的染色率。于花期的晴天进行试验,测定前1天选择于次日将开放的花序,对远志植株进行标记。早上9:00—10:00采集开花前一天、第1天、第2天、第3天、第4天、第5天、第6天、第7天、第8天的花各5朵,收集不同开花天数的花粉,将花粉撒在载玻片上,分别用 I<sub>2</sub>-KI 法及 TTC 法进行染色。具体步骤:①I<sub>2</sub>-KI 法:取适量花粉与载玻片上,滴加1~2滴 I<sub>2</sub>-KI 溶液涂抹均匀,盖上盖玻

片,在保湿条件下与25℃恒温箱中培养10min后进行镜检观察花粉粒的染色情况。②TTC法:取适量花粉于载玻片上,滴加1~2滴TTC溶液涂抹均匀,盖上盖玻片,在保湿条件下于25℃恒温箱中培养15min后进行镜检,观察花粉粒的染色情况。凡被染成红色(活力较强)和淡红色(活力较弱)的花粉粒表明其具有活力,未染色或者无变化的花粉则表明其不具有活力。每个样品做3个玻片重复,每个重复观察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百分率。

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

先测定远志开花前一天到第8天期间花粉活力的变化,确定其花粉活力的高峰期;在其高峰期测定其花粉1d之内(上午8:00开始,至下午18:00,每隔2h采集花粉)的花粉活力变化。分别取其花粉于载玻片上,采用 I<sub>2</sub>-KI 法染色统计其染色率。

**2.3 花粉的贮藏性** 于盛花期采集已完全开放的远志花朵,将其放置于含有硅胶的干燥器中干燥24h后,再采集新鲜花朵,将采集的新鲜花朵和干燥花朵分别分成4等份,然后分装于培养皿中,而后置于室内自然温度条件(26℃),4,-20,-80℃条件下保存。每个条件下鲜花朵和干燥花朵各保存3份,分别于2,4,8,24,48,72h后采用 I<sub>2</sub>-KI 法快速测定花粉的活力。

**2.4 柱头可授性检测** 分别对其不同天数的柱头长度和花柱长度进行测量,重复3次,分析不同天数柱头长度和花柱长度是否与柱头可授性的有关。采用联苯胺-过氧化氢法测定柱头的可授性<sup>[12-14]</sup>。具体方法是将远志开花前进行去雄处理。分别采集开花前一天、开花第1天、第2天、第3天、第4天、第5天、第6天、第7天、第8天的花朵,取其柱头,然后将其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4:11:22)的凹面载玻片凹陷处,用4×10双目显微镜观察柱头的反应情况。可以通过比较其气泡量来衡量其可授性的强弱。若柱头具有可授性,其迅速变成蓝色并伴有大量气泡产生;若柱头周围无气泡产生且未见蓝色,则说明柱头无可授性。每次取10朵去雄花朵,重复3次。

**2.5 数据处理与分析** 采用 Excel 2007 和 SPSS 20.0 软件对花粉活力、柱头可授性进行数据进行处理分析。

### 3 结果与分析

**3.1 开花生物学特性** 远志植株为多年生草本, 高约 20~40 cm, 根圆柱形, 具少数侧根。茎直立或斜上, 丛生, 上部多分枝。叶互生, 狭线形或线状披针形, 先端渐尖, 基部渐窄, 全缘, 无柄。花为完全花, 总状花序, 偏侧生与小枝顶端, 细弱, 通常稍弯曲; 花淡蓝紫色; 花梗细弱; 花苞片 3, 淡红色, 极小易脱落; 萼片的外轮 3 片比较小, 线状披针形, 内轮 2 片呈花瓣状, 成稍弯曲的倒卵形; 花瓣的两侧瓣呈倒卵形, 中央花瓣较大, 呈龙骨瓣状, 背面顶端有撕裂成条的鸡冠状附属物; 雄蕊 8, 花丝连合成鞘状; 花柱线形, 弯垂, 柱头二裂。花期较长, 在 5—7 月, 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 不同天数的远志花粉活力测定结果** 用 I<sub>2</sub>-KI 法, TTC 法测定远志花粉活力, 被染成红色的花粉粒则说明其具有较强活力, 淡红色次之; 未染色或者无变化的花粉粒则说明其不具有活力(图 1)。结果表明 2 种染色方法对远志花粉的染色效果一致(图 2), 不同天数的花粉活力存在显著差异, 从总体上看, 花粉活力呈现出先上升后下降的趋势。远志开花当天的花粉活力为 39.52%~43.16%, 随着时间的延长, 花粉活力先逐渐增强, 花开第 2 天到第 3 天花粉活力急剧增强, 到第 4 天时花粉活力最强, 最高达到 92.11%, 之后随着时间的延长, 花粉活力逐渐下降, 且下降幅度较大, 第 8 天时花粉活力降为 31.20%。

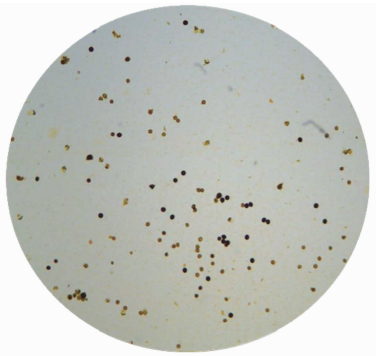


图 1 显微镜下远志的花粉染色状态(×40)  
Fig. 1 Pollen staining status of *Polygala tenuifolia* under microscope (×40)

**3.3 在 1 d 中不同时间段的花粉活力测定结果** 经过观察, 在晴天, 远志开花时间在 8:00—18:00,

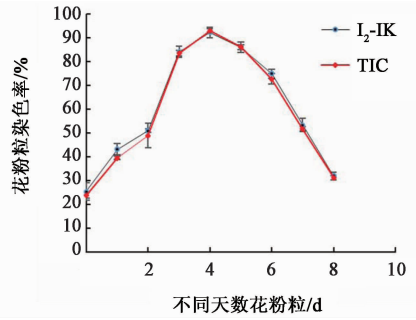


图 2 不同开花天数远志花粉活力变化( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Fig. 2 Variation of *Polygala tenuifolia* pollen viability in different flowering days( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

间隔 2 h 采集的花粉活力分别为 67.94%, 85.36%, 89.30%, 91.45%, 87.45%, 70.41%。结果表明, 在花开时间段其花粉活力均 > 65% (图 3), 在 12:00—14:00 时间段, 花粉活力逐渐增强, 最高可达 91.45%, 从 14:00 之后, 花粉活力开始缓慢下降, 到 18:00 时, 花粉活力下降为 70.41%, 依然具有较强的活力。

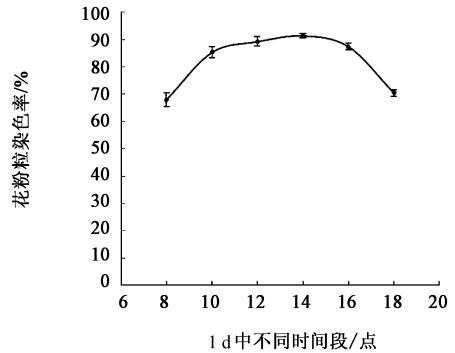


图 3 1 d 中不同时间段远志花粉活力变化( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Fig. 3 Variation of *Polygala tenuifolia* pollen viability in different periods of day( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

**3.4 不同贮藏条件下花粉活力测定结果** 采用不同贮藏条件贮藏花朵, 贮藏温度、贮藏时间对远志花粉活力存在显著的影响, 随着贮藏时间的延长, 湿法保存的花粉和干法保存的花粉活力均呈下降趋势(图 4, 5), 在 -80℃ 条件下贮藏的花粉活力保存不同时间后花粉活力均低于其他温度条件贮藏的花粉粒活力。其中湿法保存的花粉在 -80℃ 条件下活力下降最快, 4, 26, -20℃ 条件在 24 h 之内下降较缓慢, 4 个不同温度条件在 24 h 之后活力均急剧下降; 比较发现, -20℃ 冰箱中贮藏远志花朵可适当的延长其花粉活力, 在 -20℃ 冰箱贮藏 24 h 之后, 花粉粒活力仍然能达到 76.87%; 在贮藏 72 h 之后时, 不同温度贮藏的花粉粒活力均低

于 20%。其中干法保存的花粉活力在 26 ℃ 条件下活力下降最快,在 -80 ℃ 条件下活力下降次之;置于 4 ℃ 冰箱中保存干燥花朵,其花粉寿命得到适当的延长,贮藏 24 h 后,花粉活力依然高达 72.82%;在 24 h 之后,花粉活力急剧下降,贮藏 72 h 后,花粉活力仅为 20.44%。通过比较发现,远志的花粉贮藏的最佳条件为在新鲜状态下贮藏于 -20 ℃ 冰箱保存 2~24 h。

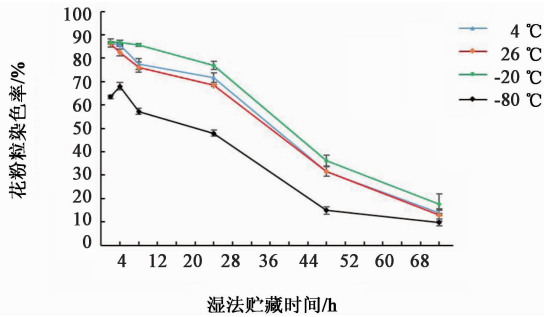


图 4 湿法不同温度贮藏段远志花粉活力变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Fig. 4 Variation of *Polygala tenuifolia* viability in farges of different temperature storage sections ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

### 3.5 柱头可授性检测结果 通过测定柱头长度和花柱长度,结果表明,开花前一天的柱头和花柱

表 1 远志开花后不同天数的柱头可授性 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 *Polygala tenuifolia* flowering after different days of stigma can be granted ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

开花后的天数/d	柱头长/cm	花柱长/cm	反应情况	柱头可授性评价
0	0.234 ± 0.005	0.176 ± 0.002	不产生气泡,柱头不着色	-
1	0.241 ± 0.008	0.177 ± 0.003	不产生气泡,柱头不着色	-
2	0.243 ± 0.003	0.178 ± 0.002	产生少量气泡,60 s 后部分柱头着色呈浅蓝色	+/-
3	0.295 ± 0.005	0.219 ± 0.003	产生少量气泡,60 s 后柱头着色呈浅蓝色	+
4	0.297 ± 0.002	0.239 ± 0.007	产生中量气泡,60 s 后柱头着色呈浅蓝色	++
5	0.303 ± 0.003	0.265 ± 0.006	产生大量气泡,30 s 后柱头着色呈深蓝色	+++
6	0.292 ± 0.005	0.259 ± 0.008	产生中量气泡,60 s 后柱头着色呈深蓝色	+++
7	0.296 ± 0.004	0.258 ± 0.002	产生少量气泡,60 s 后柱头着色呈浅蓝色	+
8	0.299 ± 0.004	0.257 ± 0.003	产生少量气泡,60 s 后部分柱头着色呈浅蓝色	+/-

注: +. 柱头具有可授性; ++. 柱头具有较强可授性; +++. 柱头具有强可授性; ++++. 柱头具有最强可授性; +/- . 部分柱头具有可授性,部分不具有可授性; -. 柱头不具有可授性。

## 4 结论与讨论

在试验中采用的 2 种测定花粉活力的方法中,用 I<sub>2</sub>-KI 法, TTC 法测定花粉活力, 2 种方法的染色效果一致,但其染色率不是很高,在测定花粉活力的方法很多,如 MTT 染色法、乙酸洋红染色法和荧光素二乙酸酯染色法<sup>[15]</sup>等,还有待于进一步研究更适合测定远志花粉活力的方法。

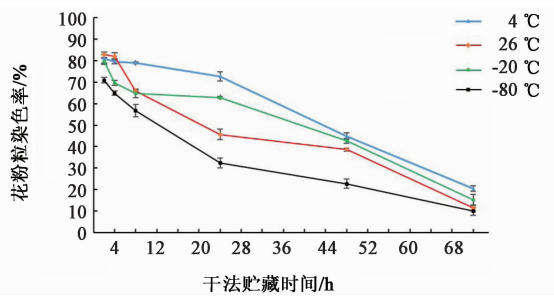


图 5 干法不同温度贮藏远志花粉活力变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 5 Variation of *Polygala tenuifolia* pollen viability in farms stored at different temperatures ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

较短,第 5 天柱头和花柱生长长度达到最大值。用联苯胺-氧化氢法测定远志柱头可授性,测定结果见表 1,图 6。从开花前一天开始,远志柱头可授性随着时间的延长逐渐增强,开花前一天柱头产生的气泡较少,柱头可授性较弱;第 3~5 天的柱头产生气泡,柱头具有可授性,其中第 5 天远志柱头产生大量气泡,说明第 5 天远志柱头可授性最高。从第 5 天之后,其柱头可授性开始呈下降趋势,到第 8 天时,其部分柱头仍然具有较弱的可授性。此观察结果表明,开花第 5 天柱头活力最强,具有较高的可授性,说明在第 5 天有结实的可能性。

花粉的活力关系到授粉的质量和授粉的成功率,柱头可授性是花朵成熟过程中非常重要的时期,象征着成熟柱头对花粉接受能力的持续时间,关系到人工授粉后结实率的高低<sup>[16]</sup>。因此,研究花粉的活力和柱头可授性是完成人工授粉前必不可少的基础性工作<sup>[17-18]</sup>。本试验研究结果表明,远志在第 4 天表现出花粉活力最强,在之后随着时间的延长,其

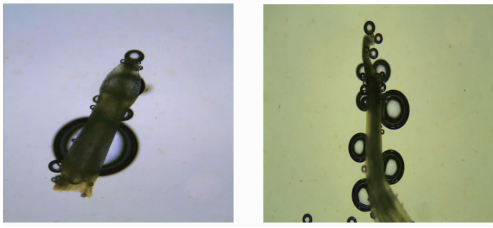


图6 显微镜下远志的柱头的冒泡状态(×40)

Fig. 6 Microscope *Polygala tenuifolia* stigma bubbling state (×40)

活力逐渐降低;在一天当中,10:00~16:00的远志花粉活力最强,可在此时间段收集花粉。将新鲜花朵保存在-20℃冰箱中贮藏24h,可以适当延长其花粉活力时间;同时,将干燥花朵置于4℃冰箱中贮藏24h,也可以适当延长其花粉活力时间。因此,可以选择在-20℃冰箱贮藏其新鲜花朵24h或在4℃冰箱贮藏其干燥花朵24h,使得远志花粉依然具有较强的活力,以便之后人工授粉。

柱头可授期的长短在很大程度上影响着授粉成功率,通过对远志柱头长度和花柱长度进行测量,以及用联苯胺-氧化氢法测定远志柱头可授性,本试验研究结果表明,在其花开放第5天柱头和花柱达到最大长度,且具有较高的可授性,说明其于第5天结实的可能性最大。综上可知,采集远志花开放后第4天的花粉对花开放后第5天的柱头进行人工授粉杂交,具有较强的可操作性。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,本研究结论可为远志的人工授粉奠定基础,为远志进行人工育种时选择父母本提供依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:156.  
[2] 崔玲. 神农本草经. 上卷[M]. 天津:天津古籍出版社,2009:41.  
[3] 孟艳,张学兰,唐玉秋,等. 远志炮制前后5种寡糖酯类成分的变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(9):10-13.  
[4] 孟艳,吴鹏,张学兰,等. 高效液相色谱-飞行时间质谱法快速鉴定远志生、制饮片的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(20):17-20.

[5] 刘大伟,康利平,马百平. 远志化学及药理作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2012,39(1):32-36,44.  
[6] 王雪洁,李震宇,薛水玉,等. 基于植物代谢组学技术的远志不同炮制品质量控制研究[J]. 中草药,2012,43(9):1727-1737.  
[7] 薛英. 基于UPLC/Q-TOF MS代谢组学和DGE转录组学技术研究远志中三萜皂苷的生物合成规律[D]. 太原:山西大学,2015.  
[8] 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.  
[9] 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.  
[10] 叶要妹,张俊卫,齐迎春,等. 百日草柱头可授性和花粉活力的研究[J]. 中国农业科学,2007,40(10):2376-2381.  
[11] 徐荣,朱维成,陈君,等. 肉苁蓉花粉活力与柱头可授性研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(3):307-310.  
[12] YI W G, Law S E, McCoy D, et al. Stigma development and receptivity in almond [J]. Ann Bot, 2006, 97(1):57-63.  
[13] 张妍,杨发君,田义新. 穿龙薯蓣花粉活力及柱头可授性测定方法研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(5):2344-2346.  
[14] 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.  
[15] 王定康,孙桂芳,郭志明,等. 滇重楼的花粉活力测定方法比较[J]. 安徽农业科学,2007,35(35):11451-11453.  
[16] 张希凤,刘红昌,李金玲,等. 三叶木通的花粉活力与柱头可授性[J]. 贵州农业科学,2016,449(5):117-119.  
[17] 左丹丹,明军,刘春,等. 植物花粉生活力检测技术进展[J]. 安徽农业科学,2007,35(16):4742-4745.  
[18] 游建军,彭建明,李荣英,等. 植物生长调节物质对白豆蔻花粉萌发和花粉管生长的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(22):172-175.

[责任编辑 顾雪竹]