

· 化学与分析 ·

广金钱草生殖生物学探索

潘海运, 唐晓敏, 杨全*, 程轩轩, 张春荣, 梅凌锋
(广东药学院 中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:考察广金钱草生殖生物学特征,为该药材的资源开发与利用提供参考。方法:通过野外观测、室内分析及人工套袋授粉等方法研究广金钱草的繁育系统、开花习性、传粉方式及花粉-胚珠比、杂交指数等生殖生物学特性。结果:广金钱草的花为两性花,开花高峰时间9:30~11:00,日开花数量随开花天数的变化近似于正态分布曲线,单花花期1~2 d,种群开花历时45 d;柱头在花即将开放到开后8 h内均具有可授性;花粉-胚珠比 $8\ 000 \pm 1\ 225$;杂交指数4;人工套袋试验显示以自交为主,异交亲和;传粉昆虫为双翅目的蜂类和膜翅目的蝇类。结论:广金钱草繁育系统以自交为主,异交亲和,需要传粉者。

[关键词] 广金钱草;繁育系统;生殖生物学

[中图分类号] R282.2;Q945.6;R931.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0034-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100034

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150401.0917.002.html>

[网络出版时间] 2015-04-01 9:17

Exploration of Reproductive Biology of *Desmodii Styracifolii* Herba PAN Hai-yun, TANG Xiao-min, YANG Quan*, CHENG Xuan-xuan, ZHANG Chun-rong, MEI Ling-feng (School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate reproductive biology of *Desmodii Styracifolii* Herba. **Method:** Reproductive system, flowering habits, pollination pattern, pollen-ovule ratio (P/O), out-crossing index (OCI) and other reproductive biology characteristics of *Desmodii Styracifolii* Herba were measured by field observation, laboratory analysis, artificial bagging pollination and other ways. **Result:** Flowers of *Desmodii Styracifolii* Herba was bisexual, blossom peak time was from 9:30 to 11:00. Flowering time was about 45 days, and single one was 1 to 2 days. Numbers of daily blossom showed normal distribution patterns. Stigmas had receptivity 1 hour before blossom and after blossom in 8 hours, P/O was $8\ 000 \pm 1\ 225$, OCI was 4. Artificial bagging test showed that breeding system of *Desmodii Styracifolii* Herba was mainly self-pollination, cross-pollination. Bees of *Diptera* and flies of *Hymenoptera* were pollinators for *Desmodii Styracifolii* Herba. **Conclusion:** Breeding system of *Desmodii Styracifolii* Herba is mainly self-pollination, cross-pollination and pollinators are needed.

[Key words] *Desmodii Styracifolii* Herba; breeding system; reproductive biology

广金钱草分布于广东、广西、福建、湖南等省区,以枝叶入药,以其作为主要原料的中成药有消石饮、消炎利胆片、消石片和金钱草冲剂等20余种^[1-2]。伴随着市场需求量的增加,广金钱草年消耗量逐年增大,野生资源供不应求,人工栽培品取而代之^[3]。目前,广金钱草在广东、广西、海南有大规模栽培^[4],以种子繁殖,但其种子体积小且成熟度不一

致,对植物生长和药材质量影响较大^[5-6]。本实验通过野外观测、室内分析及人工套袋授粉等不同方式对广金钱草的繁育特性进行研究,为该药材的杂交技术制定和新品种培育提供参考。

1 材料

广金钱草种子购于广西玉林药材市场,经广东药学院杨全教授鉴定为 *Desmodium styracifolium*,

[收稿日期] 20140730(007)

[基金项目] 国家农业部华南作物基因资源与种质创制重点实验室开放基金项目(1630032014049)

[第一作者] 潘海运,在读硕士,从事中药资源开发与药材道地性研究,Tel:13602495752,E-mail:13602495752@163.com

[通讯作者] *杨全,博士,教授,从事中药资源开发与药材道地性研究,Tel:13533381638,E-mail:yangquan7208@vip.163.com

2013 年 3 月种植于广东药学院药园内(经度 113° 41'60", 纬度 23°05'50")并进行常规水肥管理。

2 方法

2.1 开花特征观察 随机解剖即将开放的小花,观察花药散粉情况、花药颜色变化;随机选取完全开放的小花共 30 朵,用游标卡尺测量花口径、旗瓣长度和宽度、翼瓣长度和宽度、龙骨瓣长度和宽度、柱头高出雌蕊高度。另选取广金钱草 12 株,在花序上标记单花,观察并记录单花开放过程。观察并记录花序始花时间、开花数和终花时间。7:00~17:00 每 30 min 观察 1 次,连续 3 d,记录开花的日动态。

2.2 花序花朵数、果序果实数及单荚种子数分析 挂牌标记广金钱草 10 株,每株随机摘取花序 10 个,统计每个花序的花朵数,重复 3 次;果序成熟后,随机选取 45 个果序,计算结实率和结实率,结实率 = 花序荚果总数/花序花朵总数 × 100%,结实率 = 果序荚果种子总数/花序子房荚胚珠总数 × 100%。

2.3 柱头可授性检测 利用联苯胺-过氧化氢法测定柱头可授性,分别采集花即将开放时以及花开放后 0, 0.5, 1.5, 4, 6, 8, 24 h 的雌蕊柱头,用联苯胺-过氧化氢反应液[1% 联苯胺-3% 过氧化氢-水(4:11:22)]染色,若柱头具可授性,则柱头周围呈现蓝色、紫黑色或具有大量气泡出现^[7-8],每个时间段 3 次重复,每重复 20 朵花,以“-”表示柱头不具可授性,“+”表示柱头具可授性,“++”表示柱头可授性较强。

2.4 花粉组织化学及花粉-胚珠比检测 采集新鲜成熟花粉置于载玻片上,分别滴加 I₂-KI 和苏丹 IV 染液,显微镜下观察花粉粒着色情况。若 I₂-KI 染色后花粉呈现蓝色或黑色,说明花粉中含有淀粉;若苏丹 IV 染色后花粉显示出红色,表明花粉中有脂质存在^[9-10]。花粉-胚珠比测定采用血球计数法^[11]。小花取完花粉后,在体视显微镜下用解剖针划开子房,计数每个子房中的胚珠数,依据标准^[12]计算 P/O, P/O = 每朵花的花粉量/胚珠数目。

2.5 杂交指数的估算及套袋试验^[9] 对花进行以下处理(花小,操作困难,去雄时把花冠上部去除;所有处理摘除花序上部):A. 不去雄,不套袋,自由传粉,作为对照组;B. 不去雄,去花冠,不套袋,自由传粉;C. 不去雄,不去花冠,花序套袋;D. 去雄,去花冠,套袋,自花授粉;E. 去雄,去花冠,不套袋,自由传粉;F. 同株异花授粉,去雄,去花冠,套袋,人工同株异花授粉;G. 异株异花授粉,去雄,去花冠,套袋,人工异株异花授粉;H. 植株隔离于无昆虫的环境中。

2.6 访花昆虫的种类 盛花期连续 3 d 捕捉访花昆虫,测量虫体数量特征。选择晴天 6:00~20:00 记录出现在视野中的昆虫总数并拍照。捕捉昆虫,用 70% 乙醇将昆虫致死制作成标本以鉴定种类。

3 结果与分析

3.1 广金钱草花部形态特征和花器大小 花序为总状花序,腋生或顶生;每个苞片里 2 朵小花,花由花萼、花冠、雄蕊和雌蕊构成;花萼 5 裂,花冠蝶形,花瓣 5 片;二体雄蕊,9 枚联合,另 1 枚分离。花完全开放后的花口径(8.10 ± 0.599) mm,旗瓣长宽分别为(5.68 ± 0.283), (6.11 ± 0.314) mm;翼瓣长宽分别为(4.73 ± 0.334), (2.47 ± 0.236) mm,龙骨瓣长宽分别为(5.78 ± 0.245), (2.03 ± 0.150) mm,柱头 + 子房总长(5.78 ± 0.265) mm,柱头高出花药的距离(1.56 ± 0.104) mm。

3.2 花序小花开放过程 小花发育过程可分为 6 个时期,依次为花瓣被花萼包被;花萼分化出 5 个裂片,并在裂片间出现花瓣,其长度未超过花萼;花瓣长度超过花萼,旗瓣尚未翻卷,翼瓣尚未露出;旗瓣尚未翻卷,翼瓣露出;旗瓣向外翻卷,翼瓣露出;旗瓣向外翻卷,龙骨瓣从翼瓣中间露出,花开放。单花花期较短,小花开放到凋谢需 1~2 d。日开花高峰时间 9:30~11:00,开花率达(71.90 ± 4.69)%, (82.57 ± 18.59)% 的小花开放 60 min 后出现萎蔫,萎蔫 120 min 后(94.41 ± 13.27)% 枯萎,中午 12:00 后开花数量减少,15:00 后不再开花。花期自 9 月初约持续 45 d,花序由基部向顶部逐渐开放,部分花序顶部花蕾还未开放或开放中,底部已结荚并成熟。花序从始花到终花持续时间因花序大小而不同,小花序(花序长 ≤ 5 cm)13 d,大花序(花序长 > 5 cm)22 d。小花未开放时花瓣颜色为淡紫色,开放时有桃红色、紫色,开始萎蔫到枯萎时,呈深蓝紫色。花蕾期,花药淡黄色,与柱头分离;花开放时开始散粉,花药黄色;花药与花柱的距离较未开放时远,柱头淡绿色,呈直立状态,柱头高于花药;花柱颜色有绿色和红色。

3.3 花序开花动态、结荚数及单荚种子数

3.3.1 花序日开花动态 对 12 株广金钱草 44 个花序每天的开花数进行统计分析,结果表明花序每天开花数随时间的变化近似于正态分布曲线,正态分布方程为 $Y = \frac{1}{3.89 \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-4.55)^2}{2 \times 3.89^2}}$,小花开花高峰期在第 4~5 天。

3.3.2 单花序结荚数和单荚种子数 果序有顶生

果序和腋生果序。从开花到果荚成熟需 23 ~ 25 d。(80.11 ± 5.16)% 顶生花序和(75.50 ± 12.04)% 腋生花序的子房有 2 ~ 4 个胚珠;(3.68 ± 1.50)% 顶生花序和(16.20 ± 0.10)% 腋生花序的子房含 5 ~ 6 个胚珠。顶生花序花蕾数(62.6 ± 9.43)个,结荚数(39.6 ± 6.82)个,实际结种子数(95.2 ± 23.76)粒,均极显著高于腋生花序的花蕾数(35.5 ± 6.61)个,结荚数(19.3 ± 5.99)个、实际结种子数(59.0 ± 21.59)粒;腋生花序结实率(87.02 ± 14.28)% 极显著高于顶生花序的(67.71 ± 21.66)%。顶生花序和腋生花序的结荚率分别为(64.22 ± 11.91)%,(55.13 ± 16.31)%。

3.4 柱头可授性检测 花即将开放时柱头可授性最强,开花后 8 h 内柱头均具有可授性,花后 24 h 时柱头已无可授性。

3.5 花粉组织化学及花粉-胚珠比检测 经测定 I₂-KI 将广金钱草花粉染成黑色,苏丹 IV 染成红色,故

难以判断广金钱草花粉的类型。1 朵花的花粉数(32 000 ± 4 899)粒,每朵花雌蕊子房内的胚珠数(4 ± 1)个,花粉-胚珠比平均值 8 000 ± 1 225。依据文献[11]的标准判断广金钱草繁育系统属专性异交。

3.6 杂交指数估算 花朵直径(8.10 ± 0.599) mm, > 6 mm, 记为 3;雌蕊先熟,记为 0;柱头与花药的空间位置,分离记为 1;故杂交指数为 4。判断广金钱草繁育系统为部分自交亲和,异交,需要传粉者^[8]。

3.7 套袋试验 结果表明花冠对结荚率影响较大,广金钱草以自交为主,异交亲和,数据见表 1。

3.8 访花昆虫的种类 晴天早晨 8:00 ~ 8:30 有访花昆虫,9:00 ~ 13:00 访花昆虫达高峰,之后逐渐变少。经鉴定广金钱草传粉昆虫为双翅目蜜蜂科和切叶蜂科的蜂类,其中东亚无垫蜂和切叶蜂较为常见,偶尔见膜翅目的蝇类。传粉昆虫在花朵停留时间一般为 2 ~ 3 s,体长、胸径等形体数量性状见表 2 和图 1。

表 1 广金钱草人工授粉试验分析($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Artificial pollination test analysis of *Desmodii Styracifolii Herba* ($\bar{x} \pm s$)

处理项	花数/朵	结荚率/%	结实率/%
不去雄,自然授粉	890	58.19 ± 1.81 ^{f,E}	92.20 ± 0.32 ^{b,c,C}
不去雄,去花冠,自然授粉	105	24.68 ± 2.04 ^{d,C}	89.53 ± 2.08 ^{b,B,C}
不去雄,不去花冠,花序套袋	223	23.31 ± 1.80 ^{d,C}	94.55 ± 3.29 ^{b,c,C}
去雄,去花冠,自花授粉	121	46.22 ± 1.38 ^{e,D}	91.98 ± 2.1 ^{b,c,C}
去雄,去花冠,自然授粉	284	11.27 ± 0.54 ^{b,A}	82.35 ± 0.58 ^{a,A,B}
去雄,去花冠,人工同株异花授粉	278	17.46 ± 0.76 ^{e,B}	78.57 ± 1.15 ^{a,A}
去雄,去花冠,人工异株异花授粉	145	8.28 ± 0.98 ^{a,A}	96.38 ± 1.73 ^{c,C}
隔离于无昆虫环境的植株	883	15.51 ± 0.05 ^{e,B}	90.54 ± 0.77 ^{b,c,C}

注:同列数据后不同小写字母表示 $P < 0.05$,不同大写字母表示 $P < 0.01$ 。

表 2 广金钱草传粉昆虫的形体特征

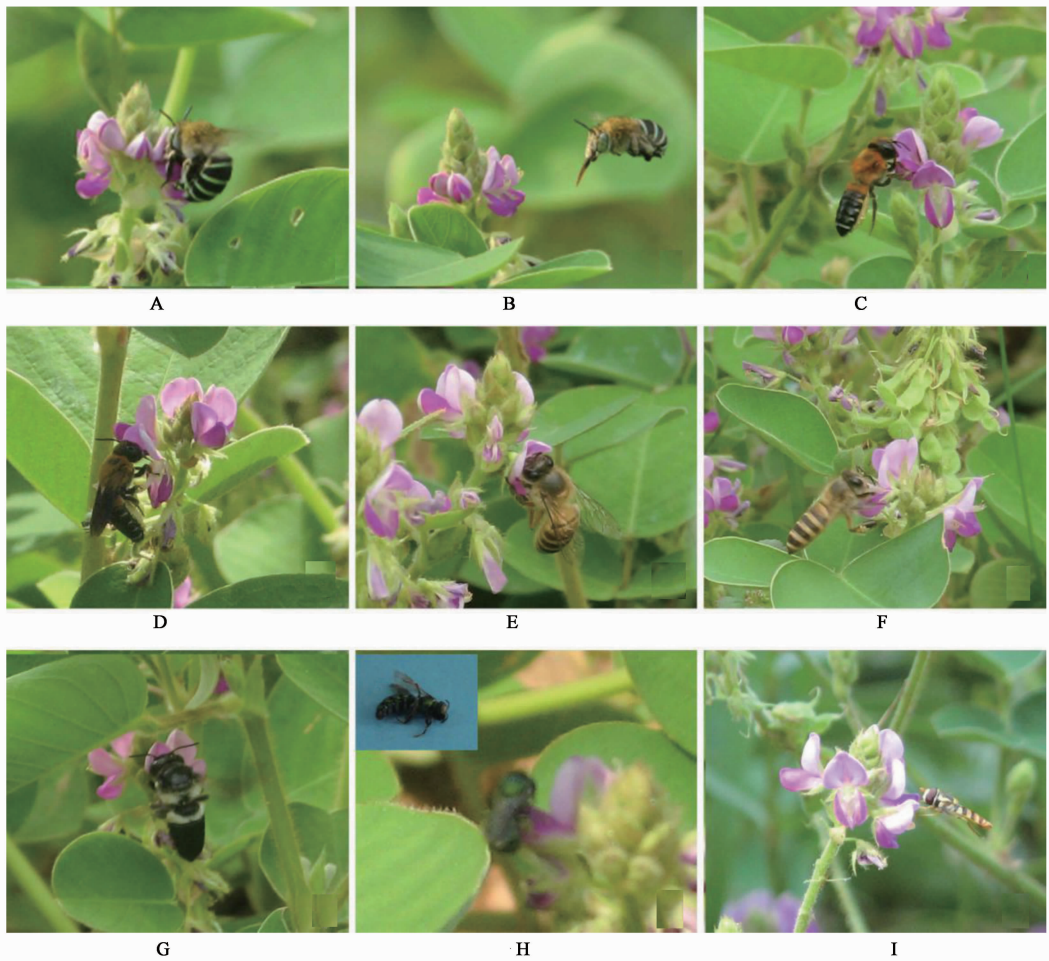
Table 2 Body characteristics of pollinating insects for *Desmodii Styracifolii Herba*

科名	种名	胸径/mm	体长/mm
蜜蜂科 <i>Apidae</i>	东方蜜蜂 <i>Apis cerana</i> Fabricius	3.46	9.31
蜜蜂科 <i>Apidae</i>	东亚无垫蜂 <i>Amegilla</i> (<i>Zonamegilla</i>) <i>parhypate</i> Lieftinck	4.62	13.54
蜜蜂科 <i>Apidae</i>	绿芦蜂 <i>Ceratina smaragdula</i> .	2.57	8.73
切叶蜂科 <i>Megachilidae</i>	<i>Megachile</i> sp1.	3.67	13.11
切叶蜂科 <i>Megachilidae</i>	<i>Megachile</i> sp2.	5.16	12.98
食蚜蝇科 <i>Syrphidae</i>	短刺刺腿食蚜蝇 <i>Ischiodon cutellaris</i> Fabricius	2.57	7.91

4 讨论

本文研究发现广金钱草约上午 8:00 开放,9:30 ~ 11:00 进入开花高峰期,开花率达(71.90 ± 4.69)%。马春英等^[7]发现甘草 10:00 ~ 16:00 开花

率达 38.9%,20:00 到第 2 d 早晨 6:00 开花也较多。大豆开花多集中在上午,下午极少^[13];苜蓿小花上午 8:00 左右开放,10:00 ~ 14:00 达开花高峰^[14]。本文结果与甘草开花特征明显不同,与豆科



1,2. 东亚无垫蜂;3,4. *Megachile* sp1.;5,6. 东方蜜蜂;7. *Megachile* sp2.;8. 绿芦蜂;9. 短刺刺腿食蚜蝇

图 1 广金钱草传粉昆虫类型

Fig. 1 Pollination insects of *Desmodii Styracifolii* Herba

其他植物相似。花部形态特征是植物性表达多样性的一个重要组成部分^[15]。花部结构是长期繁殖适应的结果,花部形态特征影响着昆虫访花行为^[16]。试验过程中观察到去花冠后的小花无传粉昆虫访花,花冠颜色及停留平台对广金钱草的昆虫传粉过程影响较大,但仍能结实,故推测风媒对广金钱草起到传粉作用。李永泉等^[17]研究发现淀粉型花粉中含有脂肪,非淀粉型花粉中含有淀粉。膜翅目和双翅目昆虫传粉的类群主要为非淀粉型。广金钱草花粉既能被 I₂-KI 染成黑色,也能被苏丹 IV 染成红色,传粉昆虫为膜翅目和双翅目昆虫,故推测广金钱草花粉为非淀粉型。

花粉-胚珠比、杂交指数和套袋试验被广泛用于研究的植物繁育系统^[18]。本文杂交指数结果表明广金钱草的繁育系统部分自交亲和,异交,需要传粉者,而花粉-胚珠比表明繁育系统属于专性异交。套袋试验中人工同株异花授粉和异株异花授粉均能结

荚和结实,表明广金钱草异交亲和;试验过程中观察到广金钱草柱头高于花药,花未开放时花药贴近花柱;开放后,花药远离花柱,进一步表明广金钱草异交亲和;自花授粉的结荚率极显著高于人工同株异花授粉和异株异花授粉,表明广金钱草以自交为主,异交亲和;自花授粉的结荚率极显著低于自然授粉,推测去除花冠后,花冠的损伤影响营养物质和水分的运输或者花冠损伤后蒸腾作用增强影响了子房,从而降低了结荚率。综合花粉-胚珠比、杂交指数及套袋试验的研究结果,推测广金钱草繁育系统以自交为主,异交亲和。

[致谢] 中国科学院动物研究所朱朝东和牛泽清研究员在昆虫鉴别上提供的帮助。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:43-44.
[2] 王植柔,白先忠,刘锋,等. 广金钱草化学成分的研究

- [J]. 广西医科大学学报, 1998, 15(3): 10-14.
- [3] 蒙爱东. 药用植物广金钱草的研究进展[J]. 广西科学院学报, 2008, 24(2): 148-151.
- [4] 杨全, 李书渊, 程轩轩, 等. 广金钱草资源调查与药材质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3): 147-151.
- [5] 董青松, 蒙爱东, 黄秋银, 等. 广金钱草种子颜色与发芽率相关性试验研究[J]. 中国种业, 2007(10): 36-37.
- [6] 唐晓敏, 程轩轩, 杨全, 等. 广金钱草种子萌发特性及种子硬实研究[J]. 种子, 2014, 33(3): 78-81.
- [7] 马春英, 王文全, 张学静, 等. 乌拉尔甘草花部特征和开花结荚特性的研究[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(2): 295-299.
- [8] 廖云海, 陆嘉惠, 张际昭, 等. 光果甘草生殖生物学特性的初步研究[J]. 西北植物学报, 2010, 30(5): 939-943.
- [9] Dafni A. Pollination ecology: a practical approach[M]. New York: Oxford University Press, 1992: 1-59.
- [10] Baker H G, Baker I. Starch in angiosperm pollen grain and its evolutionary significance[J]. Am J Bot, 1979, 66(5): 591-600.
- [11] 孙颖. 百子莲繁殖生物学研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009.
- [12] Cruden R W. Pollen-ovule ratios: A conservative indicator of breeding systems in flowering plants[J]. Evolution, 1977, 35(1): 7-13.
- [13] 宋书宏, 董钻. 不同大豆品种开花结荚习性比较[J]. 中国农业科学, 2002, 35(11): 1420-1423.
- [14] 张爱勤, 朱进忠, 谭敦炎. 新牧1号杂花苜蓿开花习性及弹花现象与环境因子的研究[J]. 草业学报, 2006, 15(4): 43-50.
- [15] Cohen J I. "A case to which no parallel exists": The influence of Darwin's different forms of flowers[J]. Am J Bot, 2010, 97(5): 701-706.
- [16] Harder D L, Johnson S D. Darwin's beautiful contrivances: evolutionary and functional evidence for floral adaptation[J]. New Phytol, 2009, 183(3): 530-543.
- [17] 李永泉, 罗中莱, 张奠湘. 叶下珠科花粉组织化学、花粉数和胚珠数及其与传粉者关系的研究[J]. 生物多样性, 2007, 15(6): 645-651.
- [18] 万德乾, 郭巧生, 刘丽, 等. 夏枯草繁育系统的初步研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(6): 800-804.

[责任编辑 刘德文]

《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD(E)

经过中国科学院“中国科学引文数据库(Chinese Science Citation Database, 简称 CSCD)”定量遴选、专家定性评估,《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD(E)。

2015—2016 年度 CSCD 收录来源期刊 1200 种, 其中中国出版的英文期刊 194 种, 中文期刊 1006 种。CSCD 来源期刊分为核心库和扩展库两部分, 其中核心库 872 种(以备注栏中 C 为标记); 扩展库 328 种(以备注栏中 E 为标记)。

CSCD 具有建库历史最为悠久、专业性强、数据准确规范、检索方式多样、完整、方便等特点, 自提供使用以来, 深受用户好评, 被誉为“中国的 SCI”。CSCD 是我国第一个引文数据库, 曾获中国科学院科技进步二等奖。该数据库已在我国科研院所、高等学校的课题查新、基金资助、项目评估、成果申报、人才选拔以及文献计量与评价研究等多方面作为权威文献检索工具获得广泛应用。