肉苁蓉花粉活力与柱头可授性研究

徐荣[1], 朱维成[2], 陈君[1*], 王霞[1], 刘同宁[3]
(1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193;
2. 哈尔滨理工大学 计算中心, 黑龙江 哈尔滨 150080;
3. 宁夏永宁县本草苁蓉种植基地, 宁夏 银川 750100)

[摘要] **目的**:明确肉苁蓉 *Cistanche deserticola* 的花粉活力和寿命以及柱头的可授期,为肉苁蓉种子生产和良种选育提供理论依据。**方法**:比较不同生理测定方法对肉苁蓉花粉活力与柱头可授性测定的有效性和适用性,并与田间人工授粉结实率和荧光显微观察结果相比较;应用适宜方法测定不同条件下肉苁蓉的花粉和柱头的活力变化。**结果**:确定肉苁蓉花粉活力和柱头可授性的最佳测定方法分别为 MTT 法和联苯胺-过氧化氢法,测得肉苁蓉开花 3 h 后的花粉活力和柱头可授性均为最高水平,此时花粉在柱头的萌发率高达 95% 以上,活性可保持 4 ~ 5 d,而低温保存的花粉寿命可保持 10 d 以上。**结论**:肉苁蓉花粉与柱头的生理特征具有良好的生态适应性,适宜大面积田间栽培。

[关键词] 肉苁蓉;花粉生活力;柱头可授性;生态适应性

肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Ma 为列当科肉苁蓉属多年生寄生性草本植物,是我国传统名贵中药材,始载于《神农本草经》,列为上品[1],有补肾阳,益经血,润肠通便等功效[2]。近年来巨大的市场需求导致肉苁蓉资源濒临枯竭,国家明令禁止采挖野生肉苁蓉,鼓励发展人工种植满足国内外市场需要[3]。肉苁蓉药用部位为肉质茎,需要在其未进入生殖生长阶段进行药材采收,严重影响了肉苁蓉种群繁衍和更新。同时,授粉量不足、授粉不及时、种子发育不完全等因素造成的种子产量低下一直是肉苁蓉引种栽培和基地建设的制约因素。本文通过比较不同生理测定方法对肉苁蓉花粉活力与柱头可授性测定的有效性和适用性,并应用适宜方法测定不同环境条件下肉苁蓉的花粉和柱头的活力变化差异,了解开花状态和环境条件对肉苁蓉有性生殖的影响以及栽培条件下的生殖行为对策及机制,同时为肉苁蓉人工辅助授粉时期以及优良品种选育方法的选择提供必要的理论依据。

1 材料

肉苁蓉 *C. deserticola* 引种于内蒙古阿拉善的野生肉苁蓉,接种于宁夏永宁本草苁蓉种植基地四年生梭梭根部。出土肉苁蓉的生长年限 2 ~ 3 年。种植基地位于宁夏贺兰山东麓腾格里沙漠边缘的荒漠、沙丘地带,属中温带干旱气候,年平均日照时数为 2 700 ~ 2 900 h,年平均风速 2.5 m · s^{-1},最大风速 20 m · s^{-1};蒸发强烈,多年平均蒸发量 1 784.7 ~ 1 906.0 mm,年平均气温 8.7 ℃,无霜期 160 d,降水量 180 ~ 200 mm。

2 方法

2.1 花粉活力和寿命测定

2.1.1 花粉活力的不同检测方法 离体萌发法:采用牛东玲等[4]已发表的方法;蔗糖琼脂-TTC 法:根据离体萌发法[4]加以改进,在 0.6% 琼脂 + 10% 蔗糖 + 0.1% 硼酸培养基上,接种花粉量为 1 000 ~ 2 000 粒,然后加 1 ~ 2 滴 0.5% TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) 溶液,置于 35 ℃ 恒温箱中 30 min,低倍镜观察,统计约 100 粒花粉的染色情况,3 个重复。MTT 检测法:MTT 全称为 3-(4,5- dimethylthiazol- 2-yl) -2,5- diphenyltetrazolium bromide。将 100 mg MTT(噻唑蓝)溶解在 5 mL 5% 蔗糖溶液中,每个样品各加 5 ~ 10 μL MTT 蔗糖溶液混匀,室温下 15 min 后,有活性的花粉被染成红色或红褐色,显微镜观察,统计约 100 粒花粉的染色情况,3 个重复。

2.1.2 田间花粉活力变化(寿命)测定 田间定株 5 株花序,标记开花时间和散粉时间,取花药开裂后

[稿件编号] 20101013004
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30772727);国家科技支撑计划项目(2006BAI06A13-05)
[通信作者] *陈君,研究员,博士生导师,主要从事药用植物栽培和保护研究, Tel:(010) 62820904, (010) 62899731, E-mail: junzichen63@yahoo.com.cn

自然释放的花粉,或已经散落在花冠下部裂片上的花粉,取开花后的 3,8 h 和 1,2,3 d 花朵的花粉,每株各 3 朵,花粉置于载玻片中央,每个样品各加 10 μL MTT 蔗糖溶液混匀,并用甘油封片,带回室内观察统计有活力花粉的比率,

2.1.3 室内储藏花粉寿命 采集田间大花蕾期若干植株的未开裂花药共 60 枚以上。花药室内晾干开裂后取花粉测定活力,取 30 枚以上花药放于 10 mL 离心管中,4 ℃冰箱储藏,其余放于室温下,每隔 1 d 取适量花粉进行 MTT 染色,统计有活性花粉比例,直到活力微弱为止。

2.2 柱头可授粉性检测和验证

标记 10 株花序,不做套袋处理,标记开花天数。于花序盛花期,在不同开花阶段(小花蕾、大花蕾、开放 1,3,5,7 d 的花)分别在每株上取雌蕊柱头各 6 朵置于 96 孔板中,每孔 1 枚。同时对不同花期的柱头进行田间套袋授粉实验,授粉 2 h 后取不同花期的柱头各 3 枚,将柱头及其以下约 1 ~ 2 cm 长的花柱剪下,FAA 固定 24 h 后转入 75% 的乙醇中置 4 ℃下保存并进行荧光显微观察;剩余花朵于种子成熟期统计结实率。

2.2.1 柱头可授性的不同检测方法 联苯胺-过氧化氢法:在 96 孔板中盛有不同花期柱头的小孔中(3 个重复),加入 100 μL 联苯胺-过氧化氢反应液(1% 联苯胺-3% 过氧化氢-水 4∶11∶22)。若柱头具可授性,则柱头周围的反应液呈现蓝色并有气泡出现。MTT 检测法:每个样品各加 100 μL MTT 蔗糖溶液,充分浸透雌蕊群的每一个柱头,约 15 min 后观察柱头的颜色变化,若柱头处于可授期,则被染成深蓝色或深紫色;未成熟柱头不着色。

2.2.2 荧光显微镜观察 前处理方法参照 Martin[5] 的方法并稍做改进,350 ~ 400 nm 紫外光下,Leica 荧光正置显微镜(DM 2000F)观察花粉粒的萌发、花粉管在花柱及子房中的生长路径。

3 结果与分析

3.1 肉苁蓉的花粉生活力和寿命

3.1.1 花粉生活力测定方法比较 肉苁蓉每枚雄蕊的顶端为 1 枚花药,每枚花药具有 2 个花粉囊,外壁被长柔毛,尖端向下,开裂散粉,见图 1。自然状态下干燥的肉苁蓉花粉呈长卵圆形,纵向有 3 条突起的棱,棱间为 3 个萌发孔。吸水膨胀后花粉粒变成近圆形。比较离体萌发、蔗糖琼脂-0.5% TTC 法和 MTT 染色法的效果和差异,结果显示,肉苁蓉花粉生活力的测量结果以蔗糖琼脂-TTC 法最高,为 (76.6 ± 3.1)% ($\bar{x} \pm s, n = 3$),但与 MTT 法的染色率(74.5 ± 1.5)% 没有显著差异,两者均高于离体萌发的比率(60.0 ± 1.7)%,并均具有极显著性($P < 0.01$)。但因为 TTC 易见光氧化变红,不适合在室外应用。因此,MTT 法是最快速、方便,并可应用于田间的花粉活力测定方法。同时,因 MTT 法较 TTC 法更加省时方便,也可作为室内测定肉苁蓉花粉粒的首选方法。

3.1.2 田间花粉活力变化(寿命) 在田间通过 MTT 法直接测定开花不同时间后的花粉活力,见表 1。肉苁蓉花冠开口后 3 h,裂片打开与花冠筒在同一直线上,花药尖端开口散粉,测得花粉活力为 (95.5 ± 2.3)%;此时为初花期,访花昆虫数量最多,频率最高,是传粉的最佳时机。经过 8 h 后,花粉活力降低到(85.6 ± 4.7)%,此时部分花粉散落到了花冠下部裂片内侧,由于气候干燥,部分花粉失水,总体活力降低幅度较大,同时不同花序之间的差异也较大($s = 4.7$)。由于多数时间处于夜间,气温较低,因此次日 8∶30(24 h 后)测得的花粉活力降低幅度较小,花粉萌发率为(78.3 ± 2.6)%;开花 3 d 后的花粉萌发率降至(45.0 ± 2.5)%,在田间条件下,开花 5 d 后花粉基本丧失活力。

3.1.3 室内储藏花粉寿命 为估测肉苁蓉花粉的最大储存寿命,测定了室内低温和常温储藏条件下肉苁蓉花粉活力的变化曲线,见图 2。从图中可以看出 4 ℃冰箱储藏的花粉寿命较长,可长达 15 d 以上,而在室温下(18 ~ 22 ℃),肉苁蓉的活力降低较快,一般在 7 d 左右就基本丧失活力。

3.2 肉苁蓉的柱头可授性

3.2.1 肉苁蓉柱头可授性的常规检测方法比较 肉苁蓉的柱头一般为半球椭圆形或圆形,中心有小孔样凹陷,白色或稍发黄,直径一般为 2 ~ 3 mm。联苯胺-过氧化氢法和 MTT 检测法测定肉苁蓉柱头可授性结果差异见表 2。

比较发现,2 种方法均能快速得出结果,但结果差异较大,MTT 检测法染色发现,不论大小花蕾还是开放 20 d(室内)的花朵柱头均可染色。MTT 检测法原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓒并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。因此,MTT 检测

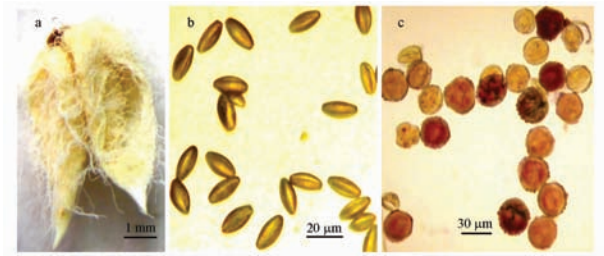


图 1　肉苁蓉的花药(a)、花粉(b)及 MTT 染色情况(c)

表 1　开花后不同时间肉苁蓉花状态、颜色及花粉活力的变化($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

测定时间	开口后时间/h	花状态	裂片颜色	花粉活力/%
11:30	3	开直、散粉	颜色最深	95.5 ± 2.3
当日 16:30	8	开平、盛开	鲜艳厚重	85.6 ± 4.7
次日 8:30	24	卷曲、变薄	颜色减淡	78.3 ± 2.6
3 日 8:30	72	萎蔫、干枯	斑驳褐斑	45.0 ± 2.5

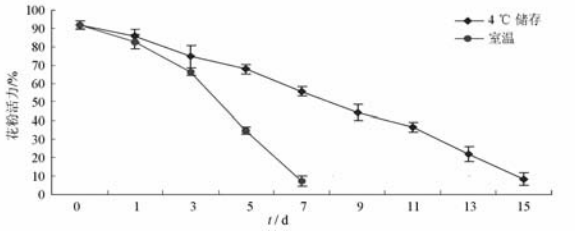


图 2　不同储存条件下肉苁蓉花粉活力变化动态

表 2　2 种检测方法测定不同开花阶段肉苁蓉柱头可授性比较

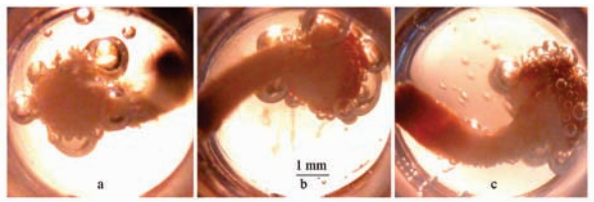
测定方法	小花蕾	大花蕾	盛花 0~1 d	褪色 2~3 d	萎蔫 4~5 d	干枯 6~7 d
联苯胺-过氧化氢法	-	+	++	++	+/-	-
MTT 检测法	++	+++	+++	+++	++	+

注:"-"没有可授性;"+"具有可授性;"+"多少表示可授性程度。

法可以准确检测柱头细胞的生活力,至于有生活力柱头细胞能否成功授粉并结实则受其他多种因素的影响。

通过授粉试验验证,在室内开放 10~20 d 但未授粉的花,虽然花冠已经干枯,但柱头仍然新鲜,授以有活力的异花花粉,5 d 后可见果实膨大,荧光显微镜下观察发现花粉管萌发正常。但田间授粉实验并未成功,可能由于风沙灰尘沾染和空气干燥造成柱头在 5 d 左右便失水变黑很难附着花粉。荧光显微观察发现,花粉在小花蕾的柱头也可以萌发,但由于此时子房并未发育完全所以不具备结实能力。

联苯胺-过氧化氢法测得的结果与过氧化物酶的活性相关,因此与柱头可授性的实际情况更相近。花蕾期,柱头上过氧化物酶活性较弱,见图 3。虽然有气泡产生但小花蕾柱头没有变色,大花蕾柱头轻微变蓝;花开放 3 h 后柱头开始具有明显的过氧化物酶活性,测定后柱头产生大量的气泡并变成蓝色;2~3 d 后柱头开始变成浅黄色,过氧化物酶活性迅速减弱。5 d 后,柱头变成黄褐色,过氧化物酶活性彻底减弱,但部分植株的柱头较花被短,仍然保持活性。随着花冠裂片的枯萎,7 d 后柱头彻底变成褐色,过氧化物酶活性完全检测不到。因此,用联苯胺-过氧化氢法能得到较好的规律性,而且与田间的授粉实验结果相符,见图 4。



a. 小花蕾期; b. 大花蕾期; c. 开花 3 h。

图 3　不同花期肉苁蓉雌蕊柱头联苯胺-过氧化氢法测定的可授性比较

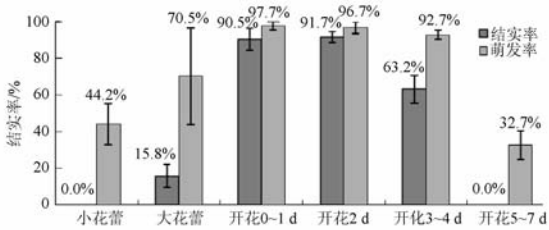


图 4　肉苁蓉不同开花阶段田间异花授粉结实率及授粉 2 h 后花粉萌发率

3.2.2　不同花期肉苁蓉柱头可授性的田间异花授粉萌发率和结实率检测　通过田间人工授粉实验验证肉苁蓉柱头可授性的结果显示,盛花期结实率最高,可达(97.7 ± 2.5)%,小花蕾期和开花 7 d 后均不结实,与联苯胺-过氧化氢法测得的结果较一致。而不同花期柱头授粉 2 h 后花粉萌发的荧光显微结果显示,花粉在小花蕾、大花蕾、盛花期以及开放 5 d 后的柱头上均能正常萌发,在小花蕾柱头授粉,最低花粉萌发率 34.5%,这与 MTT 法测得的柱头可授性

结果较为一致。在大花蕾柱头授粉,花粉萌发率最高达 95% 以上,最低为 43.8%,并且均已经汇入花柱,最长为 13 mm。开花 3 ~4 d 的柱头上花粉萌发率也均能达到 90% 以上,但在 5 ~7 d 后的柱头上花粉的萌发比例明显降低,见图 4。

4 结论与讨论

4.1 肉苁蓉花粉和柱头的活力变化与寿命

通过研究确定 MTT 法是肉苁蓉花粉活力较 TTC 法和离体萌发方法省时方便,并适用于田间快速测定。同时确定肉苁蓉柱头可授性的最佳测定方法为联苯胺-过氧化氢法,田间测得肉苁蓉开花 3 h 后的花粉活力和柱头可授性均为最高水平,此时花粉在柱头的萌发率高达 95% 以上,因此,在此时期采集花粉对肉苁蓉进行人工辅助授粉的成功率最高。肉苁蓉花粉和柱头的寿命均可持续 4 ~5 d,而低温保存的花粉寿命可达 10 d 以上,因此采集的花粉可于 4 ℃冰箱储藏,用于花期不遇的种质间授粉,这对于优良品种的选育具有重要意义。

4.2 肉苁蓉花粉和柱头生理特征的生态适应性

肉苁蓉生长于干旱荒漠地区,传粉昆虫较少,作为异花授粉植物[6],肉苁蓉的花粉与柱头必须保持较长的寿命以完成有性生殖过程。肉苁蓉人工种植后,植株密度增加,传粉昆虫种类增多,有利于异花授粉,结实率得到提高,因此,肉苁蓉花粉与柱头的生理特征具有良好的生态适应性,更加适宜大面积的田间栽培环境。由于肉苁蓉花粉和柱头同期成熟,造成自花的花粉很容易落到柱头上,但田间人工授粉实验结果表明肉苁蓉自交不结实。为避免自交,肉苁蓉柱头上可能存在抑制花粉萌发的物质,有待进一步研究证明。

[参考文献]

[1] 屠鹏飞, 何燕萍, 楼之岑. 肉苁蓉本草考证[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(1): 3.
[2] 中华人民共和国濒危物种进出口管理办公室、中华人民共和国濒危物种科学委员会. 濒危野生动植物种国际贸易公约(CITES), 附录 II[S]. 2003: 41.
[3] 傅立国. 中国植物红皮书. 第 1 册[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 502.
[4] 牛东玲, 宋玉霞, 郭生虎, 等. 肉苁蓉花粉生活力测定研究[J]. 中草药, 2004, 35(6): 679.
[5] Martin F W. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence[J]. Stain Technology, 1959 (34): 125.
[6] 陈君, 刘同宁, 程惠珍, 等. 肉苁蓉传粉特性研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(6): 504.

Pollen viability and stigma receptivity of *Cistanche deserticola*

XU Rong[1], ZHU Weicheng[2], CHEN Jun[1*], WANG Xia[1], LIU Tongning[3]
(1. *Institute of Medicinal Plant Development*, *Chinese Academy of Medical Sciences*, *Beijing* 100193, *China*;
2. *Harbin University of Science and Technology*, *Harbin* 150080, *China*;
3. *Ningxia Yongning Plantation of Herba Cistanche*, *Yinchuan* 750100, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To study the characteristics of pollen viability and stigma receptivity of *C. deserticola* and provide theory basis for seed production and breeding of *C. deserticola*. **Method**: Different physiological measurement methods were applied to evaluate pollen viability and stigma receptivity. The results of different methods were compared with the seed setting percentage of the cross-pollination in the field test and pollen germination percentage by fluoroscope observation methods. The changes of pollen vitality and stigma receptivity in different conditions were tested using proper methods. **Result**: The optimum methods on pollen viability and stigma receptivity detection were MTT-test and Benzidine-Hydrogen Peroxide method respectively. Results showed that the mean pollen viability and stigma receptivity were both the highest in inchoate anthesis with pollen germination percentage up to 95%, and can maintain viable for 4-5 d, but at the lower temperature of 4 ℃, the pollen can be stored up to 10 days. **Conclusion**: The physiological characteristics of pollen and stigma of *C. deserticola* displayed good ecological adaptation, which are much more adaptive to the large area of cultivation condition.

[**Key words**] *Cistanche deserticola*; pollen viability; stigma receptivity; ecological adaptation

doi:10.4268/cjcmm20110317

[责任编辑 吕冬梅]