

滇重楼和毛重楼花粉活力和柱头可授性的研究

王定康¹, 孙桂芳², 翟书华¹, 王荔芳³, 郭志明⁴

(1. 昆明师范高等专科学校 生物系, 昆明 650031; 2. 昆明医学院 教务处, 昆明 650032;
3. 云南大学 信息学院, 昆明 650091; 4. 宣威市农业局, 云南 宣威 655400)

摘要: 用 TTC 法测定了滇重楼和毛重楼花粉的活力, 用联苯胺—过氧化氢法测定了其柱头的可授性。结果表明滇重楼的花粉活力在散粉后第 1 天活力较高以后则逐渐下降, 在第 2 天和第 19 天花粉活力则急剧下降, 但能维持 20~23 d, 在整个花期中基本都具有活力。毛重楼的花粉寿命约为 4 d, 第 2 天花粉活力达到最大值, 第 3 天后花粉活力急剧下降, 总体活力较低。滇重楼和毛重楼的柱头在整个花期中几乎都具有可授性, 但滇重楼在 11~13 d 时柱头可授性最强, 毛重楼在第 5 天可授性最强。两种重楼植物花粉活力较高的时期与柱头可授性较强的时期不一致, 但柱头可授性较强的时间与分泌黏液较多的时间基本一致。

关键词: 滇重楼; 毛重楼; 花粉活力; 柱头可授性

中图分类号: Q944.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)04-0443-04

Pollen vitality and stigma receptivity of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and *P. mairei* (Trilliaceae)

WANG Ding-Kang¹, SUN Gui-Fang², ZHAI Shu-Hua¹,
WANG Li-Fang³, GUO Zhi-Ming⁴

(1. Department of Biology, Kunming Teacher's College, Kunming 650031, China; 2. Teaching Office, Kunming Medical College, Kunming 650032, China; 3. School of Information Science and Engineering, Yunnan University, Kunming 650091, China; 4. Xuanwei Bureau of Agriculture, Xuanwei 655400, China)

Abstract: Pollen viability of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and *P. mairei* was evaluated by TTC(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) test, the stigma receptivity was estimated by benzydine-H₂O₂ method. The results were as follows: the pollen viability of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* was the highest at the first day shedding pollens, then fell down gradually and lasted about 20 to 23 days. It could remain viable for nearly the entire flowering period but fell down suddenly in the second day and the 19th day. The pollen viability of *P. mairei* reached to a summit in the second day but fell down suddenly in the third day, the life-span was relatively short, only four days. The stigma of both species of *Paris* had receptivity during blooming period. It was the highest at 11 to 13 days after blooming in *P. polyphylla* var. *yunnanensis* but in *P. mairei* it was at the fifth day. There was a discrepancy in the peak time of pollen viability and stigma receptivity in both species of *Paris*. The summit of stigma receptivity and mucus secretion was nearly the same in two species.

Key words: *P. polyphylla* var. *yunnanensis*; *P. mairei*; pollen viability; stigma receptivity

重楼属(*Paris*)植物隶属于延龄草科(Trilliaceae) 国有 19 种, 10 个变种, 在云南分布最为集中, 有 14 种, 其中 3 种为云南特有(李恒, 1998)。重楼属植物

收稿日期: 2007-06-12 修回日期: 2007-09-10

基金项目: 云南白药集团股份有限公司资助[Supported by Yunnan Baiyao Group Co., LTD]

作者简介: 王定康(1966-), 男, 云南宣威人, 在读博士, 副教授, 主要从事传粉生物学和繁殖生物学的研究, (E-mail)wdk117@163.com。

作为中药材,其化学成分复杂,药理活性强,临床应用范围广,具有抗癌、清热解毒、消肿止痛和止血等作用,治疗跌打损伤有独特疗效,是多种中成药的主要原料之一(汤海峰等,1998;袁理春等,2004)。近年来由于需求量逐年增加,现有药源远不能保障市场需要。加之忽视对滇重楼资源的保护和繁育,野生种质资源遭到严重破坏。另外,重楼繁殖率低,其药用部位根茎的自然生长速度十分缓慢,从种子发芽到生长成药用商品,一般需10~15 a。所以重楼药用资源再生较慢,逐年的采挖已使野生重楼资源日趋枯竭(李向东,2004),保护重楼资源已迫在眉睫。

植物传粉过程始于花药开裂和成熟花粉的散出,花粉必须在具有活力时到达适宜的接受柱头才能实现授精。因此,花粉的活力与寿命、柱头的可授性便成为传粉生态学所必须研究的内容(刘林德等,2001)。近年来,花粉活力和柱头可授性的研究已经引起了不少学者的重视,并开展了大量的工作(红雨等,2003,2005;刘林德等,2001;2004;张仁波等,2006)。本文通过对滇重楼和毛重楼进行花粉活力和柱头可授性实验分析、开花生物学特性观察和人工传粉初步试验,旨在探讨两种重楼属植物花粉活力和柱头可授性的变化规律,为进一步研究重楼属植物的有性繁殖特性奠定基础。

1 研究地点和方法

1.1 研究地点

本研究在位于昆明师范高等专科学校校园内的生物系试验基地进行,102°43' E,25°03' N,年均气温15.1℃,年均降雨量1075 mm,海拔1891 m,属低纬高原山地季风气候。

1.2 研究材料

试验材料为2004~2005年从云南各地收集并移植于昆明师范高等专科学校生物系试验基地遮荫棚内的滇重楼(*Paris polyphylla* var. *yunnanensis*)和毛重楼(*P. mairei*)植株。两种植物形态独特,1株植物1个茎,茎上只有1轮叶,顶生1枝花,花被片离生,2轮,外轮为叶状的花萼,内轮为狭线形的花瓣。滇重楼雄蕊多为2轮,花药黄色、长6~8 mm,子房绿色,花柱和柱头紫色,花期4~7月,果期9~11月;毛重楼雄蕊2轮,花药黄色、长4~7 mm,子房绿色,花柱紫色,花期4~5月,果期9~10月。试验时间为2007年4月16日~6月4日。

1.3 研究方法

(1)开花生物学特性的观察:在花蕾期,选取花期相近的健壮滇重楼和毛重楼植株的花各至少5朵,用彩色塑料标牌进行标记,在自然条件下每天观察一次花蕾,直至花朵开放,花朵开放当天,每隔二至三小时观察一次,花朵开放之后,每天早晚各观察一次,直至花丝枯萎,并对花的状态和开放过程、花药的行为等进行记录。

(2)花粉活力检测:用过氧化氢酶法测定花粉活力和寿命(张志良等,2004)。具体方法是:随机选取5株花期相近的健壮滇重楼和毛重楼植株(共计各检测5朵花),自散粉当天起每天上午10:00用毛笔涂抹花药取其花粉置于载玻片上,然后加入试剂I(0.5%联苯胺、0.5%α-萘酚、0.25%碳酸钠的混合物)和试剂II(0.3%过氧化氢)各一滴,搅匀后盖上盖玻片,放入装有湿滤纸的培养皿中于37℃恒温箱内恒温2h后在低倍镜下观察,具有活力的花粉被染成红色,不具活力的花粉不被染上色。统计盖玻片中央5~6个视野全部观测花粉中红色花粉所占比例,每个观察视野中的花粉数不少于40。

(3)柱头可授性检测:用联苯胺-过氧化氢法测定柱头可授性(张志良等,2004)。具体方法是:自开花当天起每隔1 d随机选取预先标记的5株花期相近的健壮滇重楼和毛重楼植株,于上午10:00将其柱头取下放入凹面载玻片中,并滴加联苯胺-过氧化氢反应液(1%联苯胺:3%过氧化氢:水=4:11:22,体积比)2~3滴,若柱头具有可授性,则柱头周围呈现蓝色并有大量气泡出现,根据气泡数的多少确定其柱头可授性的强弱,重复3次。

(4)柱头分泌黏液情况观察 在进行开花生物学特性观察的同时,借助放大镜对花期相近的各5株重楼植株的花自开花当天起每天对其柱头分泌黏液的情况进行连续观察。

(5)传粉试验 选取健壮的滇重楼植株的花126朵和毛重楼植株的花124朵,分别作下述处理:a.对照:不套袋、不去雄、自由传粉。b.自花传粉:开花前用硫酸纸袋套袋、将自花的花粉授予柱头。c.异花传粉:开花前去除雄、用硫酸纸袋套袋、用来源于不同植株的花粉进行异花授粉。除对照外,人工授粉均是在开花后将袋子揭开进行授粉,完成授粉后将袋子套上。滇重楼的授粉时间为开花后的第11~13天,毛重楼的授粉时间为开花后的第4~5天,每天上午10:00开始进行授粉。异花传粉的花粉选

自供体植株开花 1~2 d 的花粉。在试验期间,对套袋的花朵经常进行检查,揭袋换气,防止花朵霉坏,揭袋时严格防止昆虫在花中活动。在花瓣大部分已脱落,心皮明显增大时,去掉硫酸纸袋结束试验,并统计结实率。

(6) 统计分析: 数据统计分析采用 GraphPad QuickCalcs online Calculators 进行。

2 实验结果

2.1 开花生物学特性

两种重楼属植物每株只有一朵花,花药、柱头在花药裂开前被花被紧紧包裹着,花被张开后不久花药就开始自上而下裂开,自然天气情况下约在 9:00 左右花药全部裂开,花药表面布满花粉。18:00 左右花药又自下而上逐渐关闭,到 21:00 花药全部关闭,但花被并不闭合。一般情况下外轮的花药先裂开,内轮的花药后裂开;同一轮花药裂开的时间也略有差异。在同一试验地内,花药裂开的时间也略有差异,在光照较充足的地方花药裂开较早。关闭过程则是外轮的花药先关闭,内轮的花药后关闭,在光线较充足的地方花药关闭较晚。在开花过程中雌雄位置关系没有明显变化,但柱头在花时直立,到果期则向外卷。关闭的花药在第二天上午均又重新裂

开,两种重楼属植物的花药每天都重复着这种开裂—关闭的过程,直到花丝干枯,滇重楼平均 23 d(23±2),毛重楼平均 8 d(8±2)。

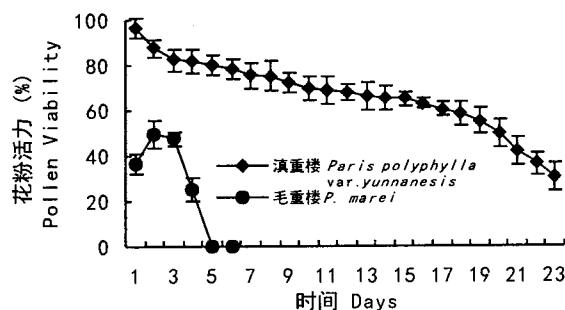


图 1 散粉不同天数滇重楼和毛重楼的花粉活力变化
Fig. 1 Pollen viability of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and *P. mairei* after shedding pollens different days

2.2 花粉活力检测结果

滇重楼的花粉在散粉当天活力较高,均高于 95%(0.965±0.046),到第 2 天和第 3 天花粉活力则急剧下降到 87.5%(0.875±0.042)和 82.4%(0.824±0.046),以后花粉活力则逐渐降低,从第 19 天后花粉活力又急剧下降,但一直到花丝枯萎前的 1~2 d(第 23 天)花粉活力仍然保持在 30%(0.31±0.061)左右。毛重楼的花粉活力先上升,后下降,

表 1 滇重楼和毛重楼柱头可授期的联苯胺-过氧化氢法检测结果

Table 1 Stigma receptivity of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and *P. mairei* by benzidine-H₂O₂

开花后日期 Date after blooming (d)	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23
滇重楼 <i>P. polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i>	+	+	+	+	++	+++	+++	++	++	+	+	+
毛重楼 <i>P. mairei</i>	+	+	++	+	-							

注:“-”示柱头不具可授性;“+”示柱头具可授性;“++”示柱头具较强可授性;“+++”示柱头具强可授性。

Note:“-”means no stigma receptivity;“+”means stigmas have receptivity;“++”means stigmas have high receptivity;“+++”means stigmas have higher receptivity.

第 1 天的活力仅为 36.8%(0.368±0.044),第 2 天活性较高,为 49.7%(0.497±0.061),从第 3 天后花粉活力急剧下降,约到第 5 天后花粉完全失去了活力。总体看毛重楼的花粉活力明显低于滇重楼(图 1)。

2.3 柱头可授性检测结果

从表 1 可见,两种重楼植物的柱头几乎在整个花期中均具有可授性,但滇重楼开花当天至第 7 天柱头可授性一直较低,第 11~13 天可授性最强,具强过氧化物酶活性,以后则逐渐降低;毛重楼开花当天至第 3 天柱头可授性较低,第 5 天时柱头可授性

最强,约在第 8 天时完全失去可授性,丧失过氧化物酶活性。毛重楼的柱头可授性弱于滇重楼。

2.4 柱头分泌黏液情况

滇重楼和毛重楼的柱头属于湿柱头但分泌黏液均较少,滇重楼开花后 1~7 d 基本见不到有黏液分泌,第 11~13 天才有少量黏液分泌,毛重楼开花后 4~5 d 分泌少量黏液,两种重楼植物中午的分泌量均比上午和下午多。

2.5 传粉试验结果

滇重楼和毛重楼自花传粉的结实率均较低,分别为 14±8%(n=42)和 21±8%(n=41),存在显著

性差异($P < 0.0001$);对照组中滇重楼和毛重楼在自然条件下的结实率分别为 $43 \pm 12\%$ ($n=36$)和 $46 \pm 21\%$ ($n=40$),差异性不显著($P=0.0558$);异花传粉的结实率都相对较高,分别为 $61 \pm 23\%$ ($n=48$)和 $68 \pm 24\%$ ($n=43$),存在显著性差异($P=0.0004$),与对照组相比,在滇重楼中自花传粉($P < 0.0001$)和异花传粉($P < 0.0001$)均存在显著性差异;在毛重楼中,两者均存在显著性差异($P < 0.0001$)。

3 讨论

植物花粉的活力与寿命因植物种及环境条件不同而有所差别。一般认为植物的花药要在气温升高和空气干燥的情况下才会裂开以促进传粉(Faegri & van, 1979)。本实验中观察到两种重楼植物的花药存在早上裂开和晚上关闭的现象,且花粉一直到花丝枯萎前1~2 d 仍然具有活力,这与 Stanley 等(1974)报道的百合科植物的花粉在整个花期均具有活力的结果相似,Edwards 等(1992)认为相对较长的花期和花粉供体时间的延长对增强总的适合度非常重要,由于花粉具有较长的供体时间,就有可能对后代贡献更多,从而增强了雄性适合度。在 *Lilium philadelphicum* 中,Edwards & Jordan(1992)报道过裂开的花药在雨中会关闭的现象,并认为花药有效的闭合是在整个花期中保护花粉的一种适应机制,而且认为在下雨的情况下访花昆虫不活动,植物就没有必要将花粉暴露在外,是对花期相对较长、花粉得不到花被固有结构保护、访花昆虫访花频率较低的一种适应性选择。在两种重楼植物中,开花后花的独特结构也没有使其花粉得到花被的保护,另据李恒(1998)报道,滇重楼主要是蝇类传粉,而蝇类在晚上一般不活动,由此推测,两种重楼植物花药晚上关闭的现象也可能是有效保护花粉、增强雄性适合度的一种机制。

柱头可授期是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,开花不同阶段的传粉成功率等(刘林德等,2001)。不同植物的柱头可授期所持续的时间不同,从几小时到十几天不等,花期的长短、开花后的天数、以及柱头分泌物的有无等对其均有重要的影响。甚至柱头长短不同的同一种植物其柱头可授性也有差异(红雨等,2005)。滇重楼和毛重楼的柱头在整个花期中均具

可授性,且柱头可授性较高的时期也是柱头分泌黏液相对较多的时间,这为柱头粘合花粉创造了条件。

两种重楼植物花粉活力较高的时期与柱头可授性较高的时期不一致,同一朵花的柱头可授性较强期和花粉活力较高期基本没有重叠,说明存在雌雄异熟现象,传粉机制可能以异花传粉为主,是其避免自交的一种适应性机制。从人工辅助授粉的结实率统计结果也能得到进一步的证实。

参考文献:

- 汤海峰,赵越平,蒋永培. 1998. 重楼属植物的研究概况[J]. 中草药,29(12):839-842
- 李恒. 1998. 重楼属植物[M]. 北京:科学出版社:14
- 李向东. 2004. 重楼丰产栽培技术[J]. 农村实用技术,5:26
- 张志良,翟伟菁. 2004. 植物生理学实验指导[M]. (第3版). 北京:高等教育出版社:223
- Edwards J, Jordan JR. 1992. Reversible anther opening in *Lilium philadelphicum* (Liliaceae): a possible means of enhancing male fitness[J]. *Am J Bot*, 79(2):144-148
- Faegri K, van der Pijl L. 1979. The principles of pollination ecology[M]//Oxford: Pergamon Press Stanley RG and Linskens HF. 1974. Pollen: biology, biochemistry, management. Berlin: Springer-Verlag:307
- Hong Y(红雨), Liu Q(刘强), Han L(韩岚). 2003. Pollen vitality and stigma receptivity of *Paeonia lactiflora* (芍药花粉活力和柱头可授性研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 23(1):90-92
- Hong Y(红雨), Fang HT(方海涛), Na R(那仁). 2005. Pollen viability and stigma receptivity of *Prunus mongolica* (濒危植物蒙古扁桃花粉活力和柱头可授性研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 26(6):589-591
- Li J(李今). 2001. Pollination rates and seed set *Adenophora hunanensis* Nannf(药用植物沙参的传粉生物学研究)[J]. *J Jiangxi Normal Univ*(江西师范大学学报), 25(2):186-188
- Liu LD(刘林德), Zhang HJ(张洪军), Zhu N(祝宁), et al. 2001. Pollen viability and stigma receptivity of *Eleutherococcus senticosus* (刺五加花粉活力和柱头可授性的研究)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), 21(3):375-379
- Liu LD(刘林德), Zhang P(张萍), Zhang L(张丽), et al. 2004. Pollen viability, stigma receptivity and pollinators of *Weigela florida* (锦带花的花粉活力、柱头可授性及传粉者的观察)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), 24(8):1431-1434
- Yuan LC(袁理春), Chen C(陈翠), Yang LY(杨丽云), et al. 2003. Effects of temperature and gibberellin treatments on the second growth of seeds of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (温度和赤霉素对滇重楼种子二次发育的影响)[J]. *Seed*(种子), 5:33-34
- Zhang RB(张仁波), Dou QL(窦全丽), He P(何平), et al. 2006. Study on the breeding system of the endangered plant *Euonymus chloranthoides* (濒危植物缙云卫矛繁育系统研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 26(3):308-312