

多花黄精花粉萌发与传粉生物学特性*

李绪杰^{1,2}, 盛雅娟¹, 张彤¹, 吴滢¹,
解孟康¹, 熊武建³, 廖文波², 李晓红¹

1. 重要生物资源保护与利用研究安徽省重点实验室/安徽师范大学生命科学学院,安徽芜湖 241000
2. 有害生物控制与资源利用国家重点实验室/广东省热带亚热带植物资源重点实验室/中山大学生命科学学院,广东广州 510275
3. 上海市城市化生态过程与生态恢复重点实验室/华东师范大学生态与环境科学学院,上海 200241

摘要:以同质园移栽的多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* Hua 为研究对象,对其开花物候、访花昆虫种类、访花行为及传粉过程进行观察,并采用单因素和正交设计研究不同培养基(蔗糖、 H_3BO_3 、 $CaCl_2$)对多花黄精离体花粉萌发的影响,比较 I_2 -KI 染色法、MTT 染色法与 TTC 染色法测定花粉活力的差异,检测其花粉活力与柱头可授性,并统计其自然结实率。结果表明:①多花黄精花期为4月末到6月初,盛花期在5月中旬,单株、花序和单花水平的花期依次为8~13、3~7、1~3 d,开花振幅为多峰曲线式样,开花同步性较高,花期同步指数为 0.81 ± 0.12 ;②离体花粉萌发的最适条件是 150.00 g/L 蔗糖 + 200.00 mg/L H_3BO_3 + 250.00 mg/L $CaCl_2$;③TTC 染色法是快速且适宜的测定多花黄精离体花粉活力的方法;④花粉在开花前1~2 d开始有活力,在开花后2~3 d花粉活力最高,此后随着花药散粉活力逐渐下降,花枯萎后花粉活力丧失;⑤柱头在开花前1~2 d至开花后4~5 d均有可授性,其中开花后2~3 d柱头可授性最高;⑥多花黄精的传粉昆虫为中华蜜蜂 *Apis cerana*、黑带食蚜蝇 *Episyrphus balteatus* 和熊蜂 *Bombus latreille*, 中华蜜蜂是其主要的传粉昆虫;⑦多花黄精自然结实率为46.35%。

关键词:多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* Hua; 开花物候; 花粉萌发; 柱头可授性; 传粉昆虫; 中华蜜蜂 *Apis cerana*

中图分类号: Q945.34; S567.239 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579(2021)06-0110-11

The pollen germination and pollination biology of *Polygonatum cyrtonema*

LI Xujie^{1,2}, SHENG Yajuan¹, ZHANG Tong¹, WU Ying¹,
XIE Mengkang¹, XIONG Wujian³, LIAO Wenbo², LI Xiaohong¹

1. Anhui Provincial Key Laboratory of Conservation and Employment of Biological Resources / School of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China
2. State Key Laboratory of Biocontrol / Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Resources / School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China
3. Shanghai Key Laboratory for Urban Ecological Processes and Eco-restoration / School of Ecological and Environmental Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China

Abstract: In this study, we focused on the pollen germination of *Polygonatum cyrtonema* Hua in homogeneous garden. We examined the flowering phenology, floral visitors as pollinators, and pollination biology. The single factor and orthogonal test were designed to study the effect of different culture medium (sucrose, boric acid and calcium chloride) on pollen germination *in vitro*, and I_2 -KI,

* 收稿日期: 2020-11-12

录用日期: 2021-03-25

网络首发日期: 2021-04-22

基金项目: 国家自然科学基金(41401062)

作者简介: 李绪杰(1998年生),男;研究方向:植物系统分类学;E-mail: lixj267@mail2.sysu.edu.cn

通信作者: 李晓红(1979年生),女;研究方向:植物保护生物学、分子谱系地理学;E-mail: lxh79668@ahnu.edu.cn

MTT and TTC methods were applied to determine the pollen viability, the stigma receptivity at different times during flowering were estimated and the fruit production was recorded. Results showed that: ① Flowering began in late April, peaked toward the middle of May, and finished in the begin of June, the flowering lifespan of an individual, inflorescence and intact flower was 8~13 d, 3~7 d and 1~3 d respectively. The flowering amplitude of inflorescence showed a multi-peak curve, and the synchronous index is 0.81 ± 0.12 . ② The best medium for pollen germination was: sucrose 150.00 g/L + H_3BO_3 200.00 mg/L + $CaCl_2$ 250.00 mg/L. ③ TTC was the most effective method to determine pollen viability of *P. cyrtonema*. ④ The pollen was active at the first 2 days before flowering, reached highest at the second or third day of flowering, and gradually decreased with anther dehiscence and pollen released. After withering, no pollen viability was detected. ⑤ The stigma had receptivity at the first 2 days before flowering, reached highest at the second or third day of flowering, and was still receptive at the fourth to fifth day of flowering. ⑥ The pollinators of *P. cyrtonema* were *Apis cerana*, *Episyrphus balteatus* and *Bombus latreille*, and *Apis cerana* was the major pollinators. ⑦ The average fruit production of *P. cyrtonema* was 46.35%.

Key words: *Polygonatum cyrtonema*; flowering phenology; pollen germination; stigma receptivity; pollinators; *Apis cerana*

多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* Hua 是天门冬科 Asparagaceae 黄精属 *Polygonatum* 多年生草本植物, 具有药用、食用、观赏等多种经济价值, 为《中华人民共和国药典》(2020年版) 规定3种药用黄精的基源植物之一^[1]。黄精是我国传统中草药, 最早记载于《名医别录》中,《证类本草》《本草纲目》《本草图经》等也有记载^[2], 药用历史悠久。传统中医学认为黄精味甘平, 具有补中益气、健脾润肺、益肾填精等功效。现代临床医学研究证明, 黄精具有很好的调节血糖血脂、提高机体免疫力、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗衰老等功效^[3-6]。面对药材黄精市场的大量需求和野生资源的日渐枯竭, 人工栽培多花黄精以满足市场需要已是势在必行。但目前多花黄精栽培主要以根状茎进行无性繁殖, 不利于野生种群的遗传变异和栽培品种的优质化, 且易引起药材品质退化, 植株易感病虫害等问题^[7-8]。多花黄精的有性繁殖栽培是满足市场需求和保护多花黄精野生资源的可持续发展之路。

在显花植物的有性繁殖栽培中, 进行人工授粉需要保证花粉的活力及柱头的可授性。花粉活力测定方法多样, 其中花粉离体萌发法是最真实可靠的检测花粉活力的方法^[9]。花粉包含了高等植物的遗传信息, 是植物种质资源库和基因库保存的重要材料, 对花粉离体萌发条件的研究, 有助于优化花粉的低温贮藏方法^[10]。关于多花黄精

种苗繁育的研究有很多^[11-12], 但对其传粉生物学的研究报道较少, 仅刘佳等^[13]对云南金平种植基地的多花黄精的传粉方式进行研究, 另有学者对重庆市和浙江省移栽的多花黄精生殖生物学进行研究^[14-15], 安徽省地区多花黄精传粉生物学尚无系统性报道, 前人均采用TTC法测定多花黄精花粉活力, 有关多花黄精的离体花粉萌发条件探究及花粉活力测定方法的比较研究未见报道。因此, 本文以移栽自安徽省九华山地区的多花黄精为实验材料, 对其花粉萌发条件进行试验探究, 为花粉离体萌发法测定花粉活力提供理论支撑, 同时对多花黄精的传粉生物学特性进行研究, 以补充安徽省地区多花黄精传粉生物学研究资料, 并为九华黄精的人工授粉提供建议。

1 材料与方法

1.1 试验材料及试验地概况

实验材料来自于芜湖安徽师范大学同质园 (118° 22' 30.63" N, 31° 20' 9.92" E) 移栽的多花黄精。研究所用的多花黄精为根状茎繁殖, 移栽2年, 种茎来自安徽省池州市九华山地区 (117° 51' 26.66" N, 30° 33' 43.17" E)。芜湖市位于安徽省东南部, 地处长江下游, 地理坐标介于东经 117°40'~118°44'、北纬 30°19'~31°34', 该地区为亚热带湿润季风气候, 年平均气温为 15~16 °C, 日照时数约 2 000 h, 年降雨量约为 1 200 mm,

但年内降水分布不均,主要集中在春季、梅雨季节和初冬,无霜期每年达219~240 d。

1.2 开花物候观测

开花物候观测为2019年5月1日至5月28日。单株观测:观察随机选定的7株多花黄精从第1朵花开放到最后1朵花凋谢的变化。记录始花期、终花期和花期持续时间。花序观测:随机选择7株花朵即将开放的多花黄精,每株分别随机标记5个花序,开花后每日统计各花序上新增开花数、花的开放顺序、花序开放的持续时间。单花观测:随机标记35朵单花,记录单花开放的时间,同时观察其形态变化。开花振幅、同步指数计算方法:开花振幅代表所标记植株花序上单位时间的开花数,采用“花数·株⁻¹·d⁻¹”来表示;同步指数用 S_i 表示,用于检测开花同步性高低

$$S_i = \frac{1}{n-1} \left(\frac{1}{f_i} \sum_{j=1}^n e_{j \neq i} \right)$$

式中 e_j 表示个体 i 和 j 花期重叠时间(d), f_i 表示个体 i 开花的总时间(d), n 表示样地中个体总数。 S_i 的变异范围为0~1,0表示种群内个体花期无重叠,1则表示完全重叠^[16]。

1.3 花粉萌发条件探究

采用悬滴培养法,将不同开花时期的花粉与培养液充分混匀,在盖玻片中央滴入0.1 mL的培养液,然后将其覆盖在单凹孔型载玻片上,使培养液液滴对准凹孔中央,盖玻片四周用凡士林封闭。将载玻片放入垫有湿滤纸的培养皿内,置于25℃恒温箱中培养24 h。在显微镜下观察统计花粉萌发率;花粉管长度大于等于花粉粒直径即认为其已萌发,每组处理制作3枚载玻片作为3次重复,每张载玻片随机观察3个视野,每个视野统计不少于30粒花粉,若视野中花粉粒不足30粒,则更换视野统计(图1)。

花粉萌发率=(萌发花粉粒数/花粉总数)×100%。

1.3.1 蔗糖、H₃BO₃、CaCl₂单因子试验 以多花黄精盛花期花朵的花粉为试验材料。蔗糖质量浓度梯度为50、100、150、200 g/L; H₃BO₃质量浓度梯度为50、100、200、300 mg/L; CaCl₂质量浓度梯度为50、150、250、350 mg/L。用悬滴培养法进行花粉萌发试验,每组处理重复3次,于25℃恒温箱中培养24 h,在显微镜下观察并统计花粉萌发率,筛选出多花黄精花粉萌发的适宜蔗糖、H₃BO₃和CaCl₂质量浓度。



图1 悬滴培养法的花粉萌发率统计
花粉管长度大于花粉粒直径视为已萌发。

Fig. 1 Statistics of pollen germination rate in hanging drop culture method

1.3.2 蔗糖、H₃BO₃、CaCl₂正交试验 以多花黄精盛花期花朵的花粉为试验材料。在单因素试验的基础上,确立蔗糖、H₃BO₃和CaCl₂的质量浓度范围及梯度,进行L₁₆(4³)正交试验(表1)以寻求最佳的培养基配方,每组处理重复3次。

表1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

| 水平 | 因素 | | |
|----|--|---|---|
| | A $w(\text{蔗糖})/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ | B $w(\text{H}_3\text{BO}_3)/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ | C $w(\text{CaCl}_2)/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ |
| 1 | A ₁ 50 | B ₁ 50 | C ₁ 50 |
| 2 | A ₂ 100 | B ₂ 100 | C ₂ 150 |
| 3 | A ₃ 150 | B ₃ 200 | C ₃ 250 |
| 4 | A ₄ 200 | B ₄ 300 | C ₄ 300 |

1.4 化学染色法检测花粉活力的比较

以多花黄精盛花期花朵的花粉为试验材料,采用I₂-KI染色法^[17]、MTT染色法^[18]和TTC染色法^[19]分别测定花粉活力,对结果进行比较分析,筛选出最适宜的多花黄精花粉活力的检测方法。

1.5 花粉活力及柱头可授性测定

采集花蕾期、含苞期、始花期、盛花期和枯萎前、后期6个时期的新鲜花朵(图2),将适量花粉与最适浓度的培养液混合,用悬滴培养法置于25℃恒温箱中培养24 h,之后在显微镜下观察并统计视野中萌发花粉粒所占比例。

配制体积比为 $\varphi=1\%$ 联苯胺: $\varphi=3\%$ 过氧化氢:水=4:11:22的联苯胺-过氧化氢溶液,采集花蕾



图2 不同开花时期的多花黄精花朵

花蕾期(开花前3~5 d,花较小)、含苞期(开花前1~2 d,花朵未开放,花大小与始花期相近)、始花期(开花第1天,花被前端微微张开,花被片前端形成6枚裂片)、盛花期(开花后2~3 d,花被前端完全张开,外端裂片向后弯曲)和枯萎前、后期(开花后4~7 d,花被片闭合,花朵开始萎缩干枯)。

Fig. 2 The flowers of *Polygonatum cyrtoneura* in different flowering stages

期、含苞期、始花期、盛花期和枯萎前、后期6个时期的新鲜花朵,将各时期花朵的柱头置于滴有联苯胺-过氧化氢反应液的凹面载玻片中,使反应液浸没柱头,若柱头呈现蓝色并且周围反应液产生大量气泡,则说明柱头具有可授性,依据柱头染色深浅和气泡数量判断柱头可授性强弱。

1.6 传粉昆虫调查

调查时间为2019年5月11日~5月17日,每天分8:00~10:00、12:00~14:00、15:00~17:00三个时间段进行。在同质园划分出多花黄精生长状况相近的南北两块区域(面积各约20 m²,相距约8 m),采用实时追踪法^[20]和定时定点观察法相结合的调查方法对南北两个区域同时进行多花黄精传粉昆虫观察,记录昆虫访花时间、访问次数和传粉行为。

1.7 自然结实率统计

在同质园随机选定15株多花黄精,对各植株的开花数和结实数进行监测,统计其自然结实率。

1.8 数据处理

试验数据均采用SPSS 22.0进行单因素方差(ANOVA)分析,并用Duncan ($\alpha=0.05$)分析法对数据进行多重比较。统计分析和制图通过Excel 2007实现。

2 结果与分析

2.1 多花黄精开花物候

2.1.1 单株开花物候 多花黄精每年开花1次,花期为4月末至6月初,盛花期在5月中旬。由表2可见,花期持续时间为(10.57 ± 2.19) d(平均值±标准差, N=7),花期同步指数为0.81±0.12,说明多花黄精在单株水平上具有较高的开花同步性。

表2 多花黄精单株花期和花期同步指数

Table 2 Flowering duration and synchronization index of *Polygonatum cyrtoneura* individual plant

| 编号 | 始花期(月/日) | 终花期(月/日) | 花期/d | 花期同步指数 |
|-----|----------|----------|-------|--------|
| 植株1 | 05/10 | 05/21 | 11 | 0.82 |
| 植株2 | 05/08 | 05/20 | 12 | 0.76 |
| 植株3 | 05/11 | 05/26 | 15 | 0.57 |
| 植株4 | 05/10 | 05/20 | 10 | 0.88 |
| 植株5 | 05/11 | 05/19 | 8 | 0.96 |
| 植株6 | 05/11 | 05/20 | 9 | 0.93 |
| 植株7 | 05/08 | 05/17 | 9 | 0.76 |
| 平均值 | | | 10.57 | 0.81 |
| 标准差 | | | 2.19 | 0.12 |

2.1.2 花序水平开花物候 多花黄精的花为伞形花序,黄绿色,每个花序上有2~8朵小花,花蕾与花的产生和开放是从基部向上、按顺序的,枝条下部的花先开,位于枝条上部的花随后开放(图

3)。多花黄精花序开花持续时间为(5.37 ± 2.24) d(平均差±标准差, N=35)。由图4可知,花序开花物候进程为多峰曲线式样,始花后第6天开花数量达到最高值。根据花序持续时间分布频

率的统计结果(图5),多花黄精的花序开放持续时间的频率分布多为2~7 d,约占总体的73%。



图3 多花黄精开花顺序由基部花序向上开放

Fig. 3 *Polygonatum cyrtonema* open its flower from the base inflorescence

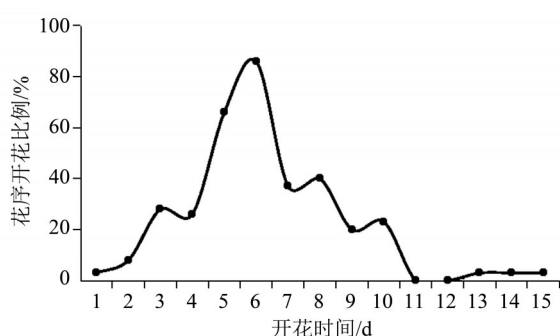


图4 多花黄精花序水平的开花振幅

Fig. 4 Amplitude of inflorescence in *Polygonatum cyrtonema*

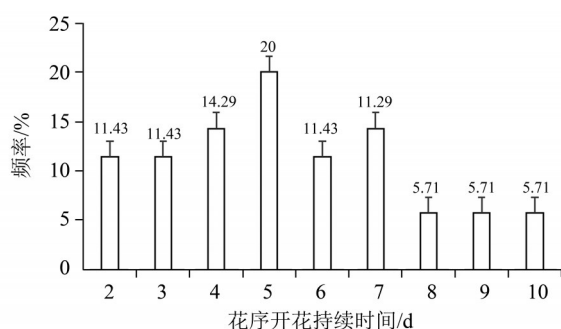


图5 多花黄精的花序开放时间频率分布

Fig. 5 Inflorescence flowering duration frequency distribution of *Polygonatum cyrtonema*

2.1.3 单花开放进程 多花黄精单花花期为(2.20 ± 0.82) d(平均差 ± 标准差, N=35),单花开放的第1天上午10:00,花朵形态饱满正常,花被前端开始张开,花被片前端形成6枚裂片。第

2天上午10:00,花被前端完全张开,花朵形态更加饱满,花被裂片向后卷曲。第3天上午10:00,单花的花被裂片开始萎蔫,颜色逐渐变为褐色。

2.2 多花黄精花粉萌发条件

2.2.1 蔗糖、 H_3BO_3 、 $CaCl_2$ 单因子对多花黄精花粉萌发的影响 蔗糖单因素实验结果表明(图6),多花黄精的花粉在50~100 g/L的蔗糖质量浓度范围内,花粉萌发率随蔗糖质量浓度的增加而提高,在100~200 g/L的蔗糖质量浓度范围内,花粉萌发率随蔗糖质量浓度的减少而降低;当蔗糖质量浓度为100 g/L时,花粉萌发率达到最高,为69.46%。因此,多花黄精花粉萌发的适宜蔗糖质量浓度为100 g/L。

H_3BO_3 单因素实验结果表明(图6),当 H_3BO_3 质量浓度在50~200 mg/L的范围时,多花黄精的花粉萌发率基本稳定,在 H_3BO_3 质量浓度为100 mg/L时,花粉萌发率达到最高,为56.32%,当 H_3BO_3 质量浓度超过200 mg/L后,花粉萌发率急剧下降。因此,多花黄精花粉萌发的适宜 H_3BO_3 质量浓度范围为50~200 mg/L。

$CaCl_2$ 单因素实验结果表明(图6),当 $CaCl_2$ 质量浓度为50~250 mg/L时,多花黄精的花粉萌发率随 $CaCl_2$ 质量浓度的增加而提高,在 $CaCl_2$ 质量浓度为250 mg/L时,花粉萌发率达到最高,为43.75%。当 $CaCl_2$ 质量浓度超过250 mg/L时,花粉萌发率开始下降。因此,多花黄精花粉萌发的适宜 $CaCl_2$ 质量浓度为250 mg/L。

2.2.2 蔗糖、 H_3BO_3 、 $CaCl_2$ 三因子 $L_{16}(4^3)$ 正交试验结果 正交试验结果表明(表3):用直观分析法分析所得数据,极差分析显示蔗糖、 H_3BO_3 、 Ca^{2+} 这三个因素对多花黄精花粉萌发的影响程度由大到小的顺序为:蔗糖、 $CaCl_2$ 、 H_3BO_3 。即蔗糖质量浓度是决定花粉萌发率的最关键因素,其次是 $CaCl_2$ 质量浓度, H_3BO_3 质量浓度的影响效果最小。

分析不同因素水平对多花黄精花粉萌发率的影响,每个因素取其平均值的最高水平,组合后得到最适宜培养基配方为 $A_3B_3C_3$,即150 g/L蔗糖+200 mg/L H_3BO_3 +250 mg/L $CaCl_2$ 。

在这个最优组合中, $CaCl_2$ 和 H_3BO_3 的适宜质量浓度与单因子试验结果一致,而蔗糖的适宜质量浓度与单因素试验结果有差别。正交试验得出蔗糖适宜浓度为15%,单因子试验得出的适宜浓度是10%,在蔗糖单因子试验中,蔗糖浓度为10%

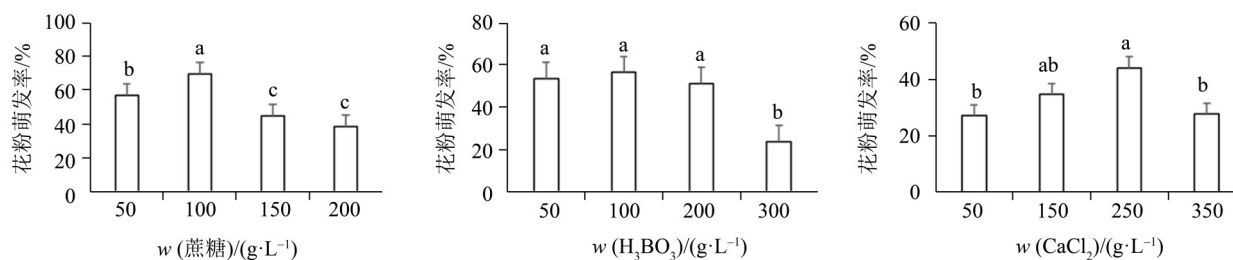


图6 不同蔗糖、 H_3BO_3 、 $CaCl_2$ 质量浓度下多花黄精花粉的萌发率 ($N=3$)
不同字母表示显著性差异 ($P<0.05$)。

Fig. 6 Pollen germination rate of *Polygonatum cyrtoneuma* in different sucrose, boric acid, calcium chloride concentrations ($N=3$)

和15%时的花粉萌发率具有显著差异, 二者结果的差别可能是因为不同因素之间对多花黄精花粉萌发的影响具有协同作用, 导致各个最优的单因

素条件搭配起来并非最适宜多花黄精花粉萌发的配方。

表3 多花黄精花粉正交试验的萌发率¹⁾

Table 3 Germination rate of *Polygonatum cyrtoneuma* pollen in orthogonal test

| 试验号 | 因素水平 | | | 观测指标 萌发率 K /% |
|-------------|--|---|--|--------------------|
| | A $w(\text{蔗糖})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ | B $w(H_3BO_3)/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ | C $w(CaCl_2)/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ | |
| 1 | 1 (50) | 1 (50) | 1 (50) | 0.00 |
| 2 | 1 (50) | 2 (100) | 2 (150) | 40.14 |
| 3 | 1 (50) | 3 (200) | 3 (250) | 52.04 |
| 4 | 1 (50) | 4 (300) | 4 (350) | 4.63 |
| 5 | 2 (100) | 1 (50) | 2 (150) | 1.85 |
| 6 | 2 (100) | 2 (100) | 1 (50) | 43.00 |
| 7 | 2 (100) | 3 (200) | 4 (350) | 39.61 |
| 8 | 2 (100) | 4 (300) | 3 (250) | 50.00 |
| 9 | 3 (150) | 1 (50) | 3 (250) | 60.91 |
| 10 | 3 (150) | 2 (100) | 4 (350) | 37.95 |
| 11 | 3 (150) | 3 (200) | 1 (50) | 54.84 |
| 12 | 3 (150) | 4 (300) | 2 (150) | 41.19 |
| 13 | 4 (200) | 1 (50) | 4 (350) | 35.66 |
| 14 | 4 (200) | 2 (100) | 3 (250) | 0.00 |
| 15 | 4 (200) | 3 (200) | 2 (150) | 0.00 |
| 16 | 4 (200) | 4 (300) | 1 (50) | 1.59 |
| K_1 平均值/% | 24.20 | 24.61 | 24.86 | |
| K_2 平均值/% | 33.62 | 30.28 | 20.80 | |
| K_3 平均值/% | 48.72 | 36.62 | 40.74 | |
| K_4 平均值/% | 9.31 | 24.35 | 29.46 | |
| R_k /% | 39.41 | 12.27 | 19.94 | |

1) 括号中的数值为因子的质量浓度; K_1 、 K_2 、 K_3 、 K_4 分别为各列中1、2、3、4水平的萌发率合计; R_k 表示全距 (K_1 平均值、 K_2 平均值、 K_3 平均值、 K_4 平均值中最大值减最小值)。

2.3 I₂-KI、MTT、TTC 化学染色法的比较

3种化学染色法测定多花黄精花粉活力的结果如表4所示。I₂-KI染色处理后经过长时间的染色,花粉粒仍难以着色,颜色差异不显著,无法明确区分出是否具有活力,因此I₂-KI染色法不能测定多花黄精的花粉活力。MTT染色法和TTC染色法

都能法能够在短时间内使花粉明显着色(图7),但MTT染色法在枯花期测得的结果偏高,原因是染色后花粉的颜色差别很小,大多是较深的蓝紫色,不易分辨,导致测定值偏高,另外该方法与萌发测定不相关^[20]。因此TTC染色法是快速有效测定多花黄精花粉活力的方法。

表4 MTT与TTC染色法测定不同时期花粉活力
Table 4 Comparison of pollen viability in different stages by MTT and TTC staining %

| 测定方法 | 花蕾期 | 始花期 | 盛花期 | 枯萎前期 |
|-----------------------|-----|------------|------------|-------------|
| I ₂ -KI染色法 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MTT染色法 | 0 | 97.30±1.99 | 89.44±4.94 | 74.68±10.20 |
| TTC染色法 | 0 | 90.27±3.09 | 88.44±8.26 | 22.42±17.07 |

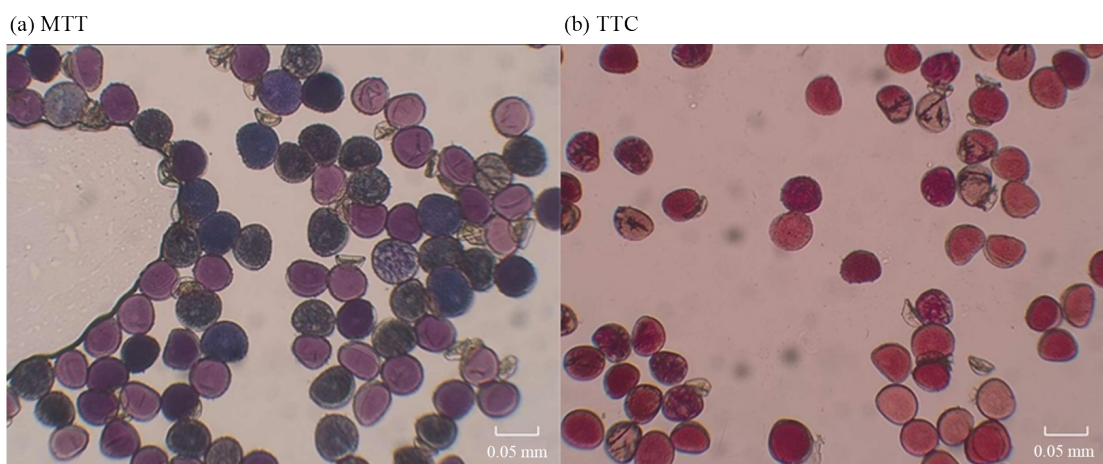


图7 MTT (a) 与TTC (b) 染色法花粉活力测定效果

Fig. 7 Effects of MTT(a) and TTC(b) staining methods on pollen vitality determination

2.4 多花黄精花粉活力与柱头可授性

通过悬滴培养法进行花粉萌发实验(表5)发现,多花黄精在含苞期开始出现花粉活力,并随着花药的开裂花粉活力逐渐上升,在盛花期达到

最高,花粉活力在始花期到盛花期阶段比较稳定,此后花粉活力随着开花后花粉的散失逐渐下降,至枯萎后期花粉活力几乎丧失。

表5 不同开花时期多花黄精的花粉活力
Table 5 The pollen viability of *Polygonatum cyrtoneuma* in different flowering periods

| 观测项目 | 花蕾期 | 含苞期 | 始花期 | 盛花期 | 枯萎前期 | 枯萎后期 |
|----------|-----|-------|-------|-------|-------|------|
| 观察花粉总数/个 | 684 | 356 | 645 | 987 | 580 | 444 |
| 萌发花粉数/个 | 0 | 235 | 479 | 781 | 220 | 2 |
| 花粉活力/% | 0 | 66.01 | 74.26 | 79.13 | 37.93 | 0.45 |

通过联苯胺-过氧化氢法检测多花黄精柱头可授性(表6),结果表明:多花黄精在花蕾期柱头颜色无明显变化,周围无气泡产生,表明其不具有可授性,见图8(a);含苞期柱头周围开始产生少量气泡,柱头颜色微微变蓝,表明该时期柱头

开始具有可授性,但是可授性较弱,见图8(b);始花期柱头周围产生较多气泡,柱头颜色变蓝,相比含苞期,其柱头可授性明显增强,见图8(c);盛花期柱头颜色变深蓝,柱头周围产生大量气泡,表明该时期多花黄精的柱头可授性最强,见图8

(d); 枯萎前期部分柱头颜色无明显变化, 柱头周围有少量气泡产生, 表明该时期柱头可授性开始减弱, 见图8(e); 枯萎后期柱头颜色无变化, 少部分柱头周围有极少量气泡产生, 大部分柱头周围无气泡产生, 表明该时期的柱头可授性逐渐消失, 见图8(f)。

表6 不同开花时期多花黄精的柱头可授性¹⁾

Table 6 The stigma receptivity of *Polygonatum cyrtonea* in different flowering periods

| 观测项目 | 花蕾期 | 含苞期 | 始花期 | 盛花期 | 枯萎前期 | 枯萎后期 |
|--------|-----|-----|-----|-----|------|------|
| 柱头染色深浅 | - | + | ++ | +++ | +/- | - |
| 柱头气泡数量 | - | + | ++ | +++ | ++ | +/- |
| 柱头可授性 | - | + | ++ | +++ | + | - |

1) -表示无结果; +表示有结果; ++和+++表示结果显著; +/-指部分有结果, 部分无结果。

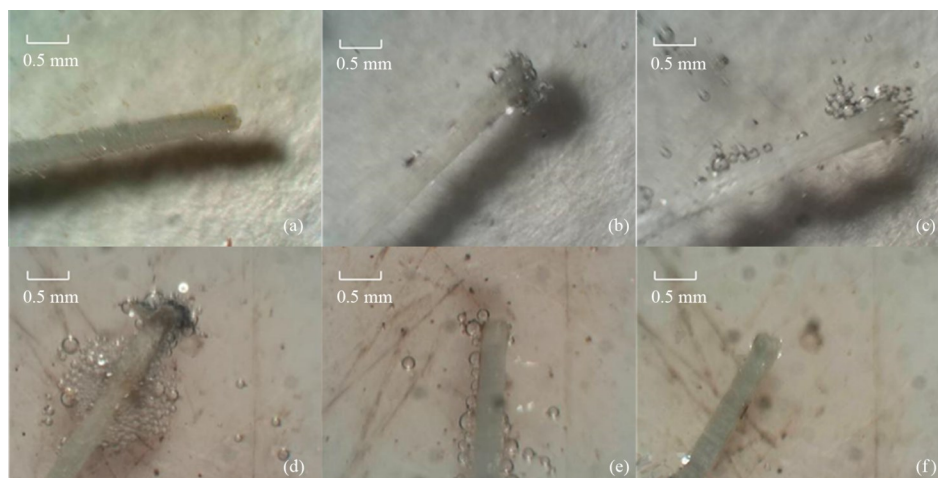


图8 不同时期的多花黄精柱头可授性变化

(a)花蕾期柱头无色, 无气泡产生; (b)含苞期柱头颜色变浅蓝, 有少量气泡产生; (c)始花期柱头颜色变蓝, 有较多气泡产生; (d)盛花期柱头颜色变深蓝, 有大量气泡产生, 此时气泡最多; (e)枯萎前期柱头无色, 气泡逐渐减少; (f)枯萎后期柱头无色, 无气泡产生。

Fig. 8 Changes of stigma receptivity of *Polygonatum cyrtonea* in different flowering periods

2.5 访花昆虫及其访花行为

2.5.1 访花昆虫种类和行为 访花昆虫种类(图9)主要有中华蜜蜂 *Apis cerana*、黑带食蚜蝇 *Episyrphus balteatus*、熊蜂 *Bombus latreille* 等。

访花行为: 中华蜜蜂访花前会先在空中盘旋, 之后落在某一株植株上开始访花, 访问第一朵花

后, 顺着茎向两侧连续访问其他的花朵, 当第一株植株访问完毕后常会跳跃飞行到临近的其他植株上继续访问。访花时直接落到花朵上, 用后足抱握花被, 中足和前足迅速收集花粉, 在采集花粉过程中会转动身体、后足来更换着力点; 黑带食蚜蝇访花时直接落到花被上, 采集花粉时头部



图9 3种访花昆虫

Fig. 9 Three species of pollinating insects

会伸入花腔, 直接伸出喙舐食花粉, 同时用两前足来回搓动花粉, 偶尔用 2 前足刷头部或 2 前足之间相互刮刷来将头部及前足粘有的花粉送到口器, 尾部常有节奏地上下摆动; 熊蜂在接近花朵时, 前足先接触花瓣并悬空震动翅膀, 使成熟花粉释放出来粘在熊蜂的前足、头部及前胸部, 之后中足和后足会交叉刮刷, 将粘附的花粉收集到花粉篮中, 动作幅度一般较大, 常会引起相邻近的花朵随之晃动。

2.5.2 传粉昆虫访花习性

1) 传粉昆虫累计访花次数。多花黄精传粉昆虫连续 7 d 的累计访花次数如表 7 所示。中华蜜蜂的累计访花次数远大于黑带食蚜蝇和熊蜂的累计访花次数, 由此可推断, 中华蜜蜂是多花黄精主要的传粉昆虫。

表 7 传粉昆虫累计访花次数¹⁾

| 昆虫种类 | 中华蜜蜂 | 黑带食蚜蝇 | 熊蜂 |
|------|-----------|---------|--------|
| 南区 | 141 (94%) | 4 (3%) | 5 (3%) |
| 北区 | 146 (92%) | 10 (6%) | 3 (2%) |

1) 括号内的数值代表该区域内该传粉昆虫访花次数占所有昆虫访花次数的比例。

2) 不同时间段传粉昆虫访花次数。5 月 11 日至 5 月 17 日连续 7 d 对传粉昆虫访花次数与每日最高温度进行了统计分析 (图 10), 多花黄精传粉昆虫在 5 月 11 日访花最多, 访花次数为 79 次, 在 5 月 15 日最少, 仅 22 次, 昆虫访花次数与日最高温

度变化呈正相关。在一定的温度范围内, 温度的升高会促进花香等化学物质的挥发, 进而提高昆虫的传粉效率。

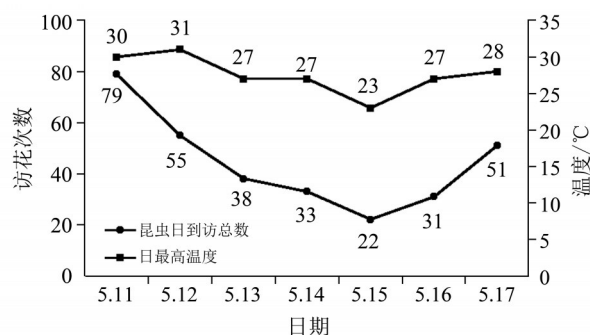


图 10 传粉昆虫访花次数与日最高温度趋势

Fig. 10 The trend of pollinating insects and daily maximum temperature

3) 传粉昆虫的每日访花时间。传粉昆虫每日访花时间如表 8 所示, 中华蜜蜂在南区的访花时间为 (1.45 ± 0.55) min (平均值 \pm 标准差, $N=7$), 在北区则为 (3.02 ± 1.31) min ($N=7$); 熊蜂的访花时间在南区为 (7.53 ± 5.57) min ($N=3$), 在北区为 1.78 min ($N=2$); 黑带食蚜蝇在南区的访花时间为 0.48 min ($N=1$), 在北区为 (11.79 ± 9.43) min ($N=2$)。熊蜂和食蚜蝇由于观测数据较少, 数值波动较大。在 7 d 的传粉昆虫观测中, 均有中华蜜蜂进行访花。中华蜜蜂在日温度较高的 5 月 11 日、5 月 17 日的访花时间明显长于日温度较低的 5 月 14 日、5 月 15 日, 说明温度对传粉昆虫访花时长有重要影响。

表 8 传粉昆虫每日访花时间

| 日期 (月/日) | 南区 | | | 北区 | | |
|-------------|------|-------|-------|------|------|-------|
| | 中华蜜蜂 | 熊蜂 | 黑带食蚜蝇 | 中华蜜蜂 | 熊蜂 | 黑带食蚜蝇 |
| 5/11 | 1.03 | 4.07 | / | 4.37 | / | / |
| 5/12 | 0.85 | / | / | 4.01 | / | / |
| 5/13 | 2.24 | 15.38 | / | 4.45 | / | / |
| 5/14 | 0.81 | 3.13 | 0.48 | 0.97 | 0.90 | / |
| 5/15 | 1.48 | / | / | 1.68 | / | / |
| 5/16 | 1.56 | / | / | 2.07 | 2.65 | 21.17 |
| 5/17 | 2.18 | / | / | 3.57 | / | 2.32 |
| 平均值 | 1.45 | 7.53 | 0.48 | 3.02 | 1.78 | 11.79 |
| 标准差 | 0.55 | 5.57 | 0.00 | 1.31 | 0.86 | 9.43 |

2.6 多花黄精自然结实率统计

通过对多花黄精的开花数和结实率进行观测记录,15个植株共开花384朵,结实178颗,自然结实率为46.35%。部分植株开花和结果时受到天气变化、动物行为等外界环境因素影响,导致落花落果严重。

3 结论与讨论

3.1 多花黄精花粉萌发条件

花粉萌发情况直接反映了花粉活力的高低,对于花粉萌发条件的探究,有助于贮藏花粉,为检测花粉的真实活力提供方法。不同植物之间的花粉的萌发条件不同,存在明显差异性。目前对多花黄精花粉萌发条件的探究实验未见报道。黄精属玉竹 *Polygonatum odoratum* 离体花粉萌发的培养液为 w 为10%蔗糖+100 mg/L H_3BO_3 +300 mg/L $Ca(NO_3)_2$ +200 mg/L $MgSO_4$ +100 mg/L KNO_3 ^[21]。本试验探究了蔗糖、 H_3BO_3 和 Ca^{2+} 等因素对多花黄精离体花粉萌发的影响。结果表明,适量质量浓度的蔗糖、 H_3BO_3 和 Ca^{2+} 能有效促进离体花粉萌发,萌发的最适蔗糖质量浓度为150 g/L,最适 H_3BO_3 质量浓度为200 mg/L,最适 $CaCl_2$ 质量浓度为250 mg/L。除蔗糖、 H_3BO_3 和 Ca^{2+} 等因素外, Mg^{2+} 、 K^+ 、培养温度和光照条件对离体花粉的萌发也有一定影响,仍需进一步实验探究。

3.2 化学染色法测花粉活力比较

植物花粉活力测定方法有TTC染色法、 I_2 -KI染色法、MTT染色法、苯胺蓝染色法、离体培养基法和悬滴培养法等^[22-23]。化学染色法具有操作便捷,反应时间短等优点而被广泛应用于花粉活力检测,但由于不同植物花粉体内的酶活力不同,不同化学染色试剂测定花粉活力的效果也存在差异性,本试验对 I_2 -KI、MTT、TTC三种化学染色法效果进行了比较,发现TTC染色法是快速、准

确地检测多花黄精花粉活力的方法。

3.3 传粉生物学特性

安徽芜湖多花黄精开花从5月8日开始,5月26日结束,花开放时间为18 d,其单株、花序和单花水平的花期依次为8~13、3~7、1~3 d;单株水平上花期同步指数为 0.81 ± 0.12 。贵州多花黄精开花从5月5日开始,5月25日结束,花开放时间为20 d^[8];云南金平多花黄精开花从4月29日开始,5月4日结束,花开放时间平均为13.6 d^[13]。不同地区的多花黄精开花物候存在差异,这可能与地理位置所造成的温度、相对湿度和光照强度等外界环境因子有关。多花黄精的花粉活力和柱头可授性总体变化趋势相吻合,均在含苞期出现活力,在盛花期达到最高值,至枯萎后期消失,这保障了多花黄精有性生殖的顺利进行,其与刘艳等^[14]对多花黄精花粉活力和柱头可授性的研究结果基本相同。多花黄精在自然状态下主要依靠中华蜜蜂、熊蜂和黑带食蚜蝇等昆虫进行传粉,昆虫种类较少且其访花效率受温度等环境因素影响,提高多花黄精的虫媒传粉效率需对传粉昆虫的生境进行保护。多花黄精自然结实率为46.35%,明显高于刘艳等^[14]17.46%的结实率,略低于刘佳等^[13]报道的60.00%和李立格等^[15]报道的65.12%,其存在一定的落花落果现象,对于多花黄精落花落果现象的生物学研究有利于在生产上提高结实率,有待后期研究发现。

3.4 人工授粉建议

基于上述的花粉活力和柱头可授性数据,多花黄精的最佳授粉时期为始花期(开花第1天)和盛花期(开花第2~3天)。在九华黄精的育种栽培中,建议采集开花第1天(花朵刚开放,花药开裂,尚未开始散粉)的花粉对开花第2~3天(花朵完全开放,柱头分泌黏液)的柱头进行人工授粉。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
- [2] 王雨婷,刘婉滢,沈舶宁,等. 黄精的本草考证[J]. 中医药学报,2019,47(3):81-86.
- [3] WANG W, DABU X, HE J, et al. Polygonatone H, a new homoisoflavanone with cytotoxicity from *Polygonatum cyrtonema* Hua [J]. Natural Product Research, 2018, 33(12): 1-7.
- [4] 罗敏,章文伟,邓才富,等. 药用植物多花黄精研究进展[J]. 时珍国医国药,2016,27(6):1467-1469.

- [5] 张娇,王元忠,杨维泽,等. 黄精属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(10): 1989-2008.
- [6] LI L, THAKUR K, CAO Y Y, et al. Anticancerous potential of polysaccharides sequentially extracted from *Polygonatum cyrtoneuma* Hua in Human cervical cancer Hela cells. [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 148:843-850.
- [7] 陆丽华,张欣,梁宗锁,等. 黄精生殖生物学特性研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(25):13687-13688.
- [8] 田启建,赵致,谷甫刚. 栽培黄精开花结实习性研究[J]. 种子, 2009, 28(1):29-31.
- [9] 蔡昭艳,董龙,王小媚,等. 培养基pH值及蔗糖、硼酸、PEG-4000对百香果花粉体外萌发的影响[J/OL]. 分子植物育种. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20201202.1458.008.html>.
- [10] de OLIVEIRA A C A, da SILVA LÉDO A, LOU P M, et al. Optimization of in vitro germination and cryopreservation conditions for preserving date palm pollen in the USDA National Plant Germplasm System [J]. Journal of Plant Biotechnology, 2020, 144 (5): 1-10.
- [11] 陈松树,赵致,刘红昌,等. 多花黄精种子育苗技术研究[J]. 中药材, 2017, 40(5):1035.
- [12] 何艳,朱玉球,肖波,等. 多花黄精组织培养体系的研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(10):2032-2037.
- [13] 刘佳,王文祥,朱翔,等. 多花黄精开花动态及传粉方式研究[J]. 种子, 2017, 36(4):41-45.
- [14] 刘艳,罗敏,秦民坚,等. 多花黄精生殖生物学特性研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(11): 71-74.
- [15] 李立格,张泽锐,石艳,等. 多花黄精生殖特性研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(5): 1079-1083.
- [16] 肖宜安,何平,李晓红. 濒危植物长柄双花木开花物候与生殖特性[J]. 生态学报, 2004, 24(1):14-21.
- [17] 周强,于国斌,朱瑞,等. 樟子松花粉形态观察及生活力测定[J]. 分子植物育种, 2019, 17(19): 6506-6510.
- [18] JANNATHAN M, CHENG X J, TAN D Y. Heteromorphism of florets and reproductive characteristics in *Heterocia szovitsii* (Asteraceae), a desert ephemeral annual herb [J]. Biodiversity Science, 2018, 26 (5): 498-509.
- [19] KOSIŃSKI I. Ontogenetic development and maturity of individuals of *Polygonatum multiflorum* [J]. Flora, 2015, 216: 1.
- [20] 龚燕兵,黄双全. 传粉昆虫行为的研究方法探讨[J]. 生物多样性, 2007, 15(6): 576 - 583.
- [21] 宫丽婷. 玉竹有性繁殖生物学特性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.
- [22] 张慧会,周琦,郭力宇,等. 香水莲花花粉的采集、干燥和贮藏特性研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2020, 40(5): 20-26.
- [23] 张超仪,耿兴敏. 六种杜鹃花属植物花粉活力测定方法的比较研究[J]. 植物科学学报, 2012, 30(1): 92-99.

(责任编辑 张冰)