

# 芫花的花粉形态观察及生活力和萌发率分析

刘芳, 汪甜, 王杨, 沈永宝<sup>①</sup>

(南京林业大学, 江苏南京 210037)

**Morphological observation and analyses of viability and germination rate of *Daphne genkwa* pollen** LIU Fang, WANG Tian, WANG Yang, SHEN Yong-bao<sup>①</sup> (Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2011, 20(1): 94-96

**Abstract:** Pollen morphology of *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. was observed by scanning electron microscope (SEM), and its viability and germination rate were measured by TTC and sucrose *in vitro* culture methods. The results show that pollen is stenopalynous type with a diameter of 15.6–21.6  $\mu\text{m}$ . Per pollen has 10–16 apertures which is irregular circular with a diameter of 1.4–2.0  $\mu\text{m}$ . Surface ornamentation of pollen is rough reticulate pattern which is circular polygon (tetragon-heptagon, mostly pentagon-hexagon). Pollen viability is 51% by TTC. Sucrose of different concentrations has a significant effect on pollen germination rate during pollen culture. And pollen germination rate is the highest with a percentage of 27.0% in medium containing 50  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  sucrose, while pollen could not germinate in medium containing sucrose over 250  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Otherwise, there is the phenomenon of “multi-aperture germination” during pollen germinating.

**关键词:** 芫花; 花粉; 形态特征; 生活力; 萌发率

**Key words:** *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc.; pollen; morphology; viability; germination rate

中图分类号: Q944.59; Q945.4 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2011)01-0094-03

芫花 (*Daphne genkwa* Sieb. et Zucc.) 别名南芫花、芫花条、药鱼草等, 为瑞香科 (Thymelaeaceae) 瑞香属 (*Daphne* L.) 的多年生落叶小灌木。芫花的干燥花蕾是著名的中药材, 具有利尿、镇咳、祛痰、抑菌、引产、抗肿瘤等功效<sup>[1]</sup>; 另外, 芫花花色艳丽、花团锦簇, 具有良好的观赏性<sup>[2]</sup>。目前, 关于芫花的研究主要集中在化学成分和药理作用方面<sup>[1,3-6]</sup>, 也有少量关于其组织培养<sup>[7]</sup>、遗传多样性<sup>[8]</sup>、病虫害防治<sup>[9]</sup>等方面的报道, 但对芫花的花粉形态及生理特性方面的研究尚未见报道。作者采用扫描电镜观察了芫花的花粉形态, 并检测了其花粉生活力和萌发率, 以期为芫花种质资源的利用和保护提供一定的实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试芫花花粉采自南京市江宁区铜山镇的丘陵地带。随机采集 10 株生长健壮的花枝, 选取成熟花药, 用体积分数 4% 戊二醛固定液 (用体积分数 25% 戊二醛和磷酸配制) 固定后, 放入冰盒内带回实验室, 用于扫描电镜观察; 将剩余花枝直接带回实验室, 用于花粉生活力测定和培养。

### 1.2 方法

1.2.1 花粉形态观察 用 0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液 (pH 7.2) 清洗芫花花粉, 用体积分数 1% 锇酸 (采用 0.2  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液配制, pH 7.2) 固定后, 再用 0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液清洗, 依次经过体积分数 30%、50%、70%、90%、100% 乙醇系列脱水, 分别用体积比为 1:1 和 1:2 的无水乙醇-乙酸异戊酯置换 2 次, 再用纯乙酸异戊酯置换后, 依次用 HITACHI HCP-2 型临界点干燥仪和 HITACHI E-1010 型离子溅射仪 (日本日立公司生产) 进行干燥和镀金, 在 FEI QUANTA-200 型扫描电子显微镜 (荷兰 FEI 公司生产) 下观察并拍照。共观察 3 张制片, 每张片选 1 个视野, 每个视野统计 50 粒花粉的直径, 计算平均值。

1.2.2 花粉生活力测定 采用 TTC 染色法检测芫花花粉生活力。随机选取经室温水培催花 24 h 的成熟花粉, 混合均匀后用毛笔蘸取少许置于载玻片上, 滴入体积分数 0.1% TTC 溶液 1~2 滴, 盖上盖玻片, 置于 35  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中在黑暗条件下染色 5 h, 然后用 OLYMPUS CX-41 型显微镜 (日本奥林巴斯公司生产) 观察并拍照。共观察 3 张制片, 每片 3 个视野, 统计每一视野中的花粉粒总数和染色花粉粒数, 计算花粉生活力, 结果取平均值。

收稿日期: 2010-12-07

作者简介: 刘芳 (1982—), 女, 安徽淮北人, 博士研究生, 主要从事园林植物应用研究。

<sup>①</sup>通信作者 E-mail: ybshen@njfu.edu.cn

1.2.3 花粉萌发率测定 在  $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂中分别添加 50、100、150、200、250 和  $300\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖,作为花粉培养基,以不添加蔗糖的  $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂为对照。将培养基滴在凹面载玻片上,冷却后用毛笔蘸取适量花粉均匀撒在培养基上,将载玻片放入铺有湿润滤纸的培养皿中,置于  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  [10] 的培养箱中培养 6 h 左右至花粉管不再伸长、萌发率不再增加为止。以花粉管长度超过花粉粒直径作为花粉萌发的标准,统计花粉粒总数和已萌发的花粉粒数,计算花粉萌发率。每处理设 3 个重复,每一重复观察 1 个视野。

### 1.3 数据处理

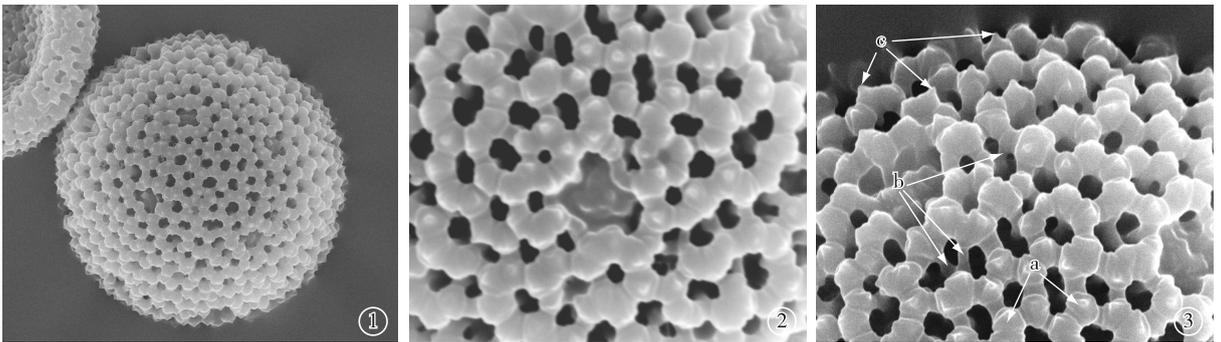
花粉生活力和花粉萌发率的计算公式分别为:花粉生活力 = (染色花粉粒数/花粉粒总数)  $\times 100\%$ ; 花粉萌发率 = (萌发的花粉粒数/花粉粒总数)  $\times 100\%$ 。利用 SPSS 13.0 分析软件

对花粉萌发率的差异显著性进行分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 芫花花粉的形态特征

芫花的花粉为单粒型,呈球形或近球形(图 1-1);直径  $15.6\sim 21.6\text{ }\mu\text{m}$ ,平均直径  $19.1\text{ }\mu\text{m}$ 。花粉粒有萌发孔  $10\sim 16$  个,近均匀分布于花粉粒表面,萌发孔呈不规则圆形(图 1-2),大小不一,孔径  $1.4\sim 2.0\text{ }\mu\text{m}$ 。花粉粒表面纹饰为粗网状结构,表面观呈梅花形(图 1-3);网格呈近四边形至七边形(多为五至六边形),网格的每个结点处膨大隆起,其基部呈近圆形或圆三角形,中部有 1 个乳突状小突起,结点间由呈“T”形或“Y”形的网脊连接。



1. 花粉外形 Pollen shape. 2. 萌发孔 Aperture. 3. 表面纹饰 Surface ornamentation; a. 结点 Junction; b. 网脊 Murus; c. 小突起 Small protuberance.

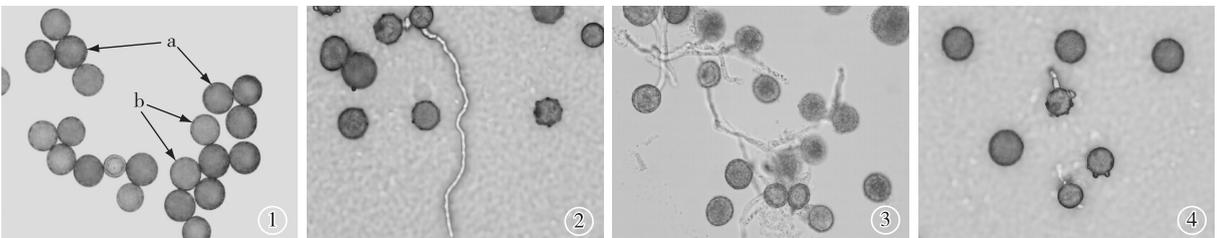
图1 扫描电子显微镜下芫花花粉的形态特征

Fig. 1 Pollen morphology of *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. under SEM

### 2.2 芫花花粉的生活力分析

采用 TTC 法检测芫花花粉的生活力,花粉的染色情况见图 2-1。统计结果显示,芫花花粉的生活力为 51%,花粉管的长度最终可以达到花粉粒直径的 10 倍左右(图 2-2)。此外,

芫花花粉萌发时出现“群体效应”(图 2-3)。芫花花粉粒有多个萌发孔,有些花粉粒出现 2 个以上萌发孔同时萌发的现象,但只有 1 个花粉管或无花粉管可以正常生长(图 2-4)。



1. 示花粉生活力 Showing pollen viability: a. 有活力花粉 Viable pollen; b. 无活力花粉 Unviable pollen. 2. 示花粉管 Showing pollen tube. 3. 示花粉萌发的“群体效应” Showing “group effect” of pollen germination. 4. 示多孔萌发现象 Showing the phenomenon of multi-aperture germination.

图2 芫花花粉生活力的观测结果

Fig. 2 Observation result of pollen viability of *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc.

### 2.3 芫花花粉的萌发率分析

用含不同质量浓度蔗糖的培养基进行培养,芫花花粉的萌发率有明显差异,且蔗糖的质量浓度较高不利于芫花花粉的萌发。其中,在含  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖的培养基中花粉的萌发率最高,为 27.0%,显著高于对照(花粉萌发率 6.2%)和其他处理组;在含 100 和  $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖的培养基中花粉萌发率差异不大,分别为 10.7% 和 9.6%;在含  $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖的培养基中花粉萌发率较低,仅 1.7%;培养基中蔗糖的质量浓度达到 250 和  $300 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,花粉不再萌发。

方差分析结果( $F=6.178, n=6$ )显示:在含不同质量浓度蔗糖的培养基中芫花花粉的萌发率差异极显著( $P<0.01$ )。

## 3 结论和讨论

芫花花粉表面纹饰为粗网状结构,每个网格的网脊中部有向内的脊柱,顶部呈“T”形或“Y”形,常围成不规则的五至六边形或近圆形的网格;网格表面观呈梅花形,网眼深陷穿孔,在网格的交接处(结点处)有乳突状膨大的隆起,其基部呈近圆形或圆三角形,顶部则有 1 个乳突状小突起。而刘炳仑<sup>[11]</sup>将此类纹饰描述为网状-巴豆型,认为此网格由呈圆形、圆三角形的薄片组成,薄片之间由长短不一的棒(网脊)连接或无短棒连接。作者认为似有不妥。

通过 TTC 染色法和蔗糖离体培养法测得的芫花花粉生活力和萌发率均不高,可能是因为芫花花粉粒网眼多且大,使得花粉易失水变形,从而丧失生活力;此外,在花粉采集过程中,多风和干燥的天气也加速了花粉生活力的丧失。通过这两种方法测得的花粉生活力也有很大差异,其中,用 TTC 染色法检测时花粉着色深浅变化较大,仅靠肉眼判断易造成实验数据偏高;而用蔗糖离体培养时一部分具有生活力的花粉不一定能够萌发,使得实验数据偏低。

蔗糖具有调节渗透势、促进花粉萌发的作用。用于芫花花粉萌发的最佳蔗糖质量浓度为  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,此结果与张亚利等<sup>[12]</sup>的研究结果一致。在蔗糖质量浓度高于  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的条

件下,花粉萌发率随蔗糖质量浓度的提高而下降,可能是由于高质量浓度的蔗糖改变了花粉管的细胞透性,对花粉萌发不利。此外,芫花花粉萌发过程中还出现了多个萌发孔同时萌发的现象,目前花粉萌发 2 个以上花粉管的现象很少见<sup>[13]</sup>,有关花粉粒萌发多个花粉管的机制还有待进一步研究和探讨。

### 参考文献:

- [1] 张保献,原思通,张静修,等. 芫花的现代研究概况[J]. 中国中医药信息杂志, 1995, 2(10): 21-24.
- [2] 田朝阳,胡颖,郭二辉,等. 河南野生木本紫花观赏植物资源调查分析[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2008, 36(2): 134-142.
- [3] 张保献,原思通,张静修,等. 芫花的现代研究概况(续)[J]. 中国中医药信息杂志, 1995, 2(11): 11-13.
- [4] Zheng W F, Shi F. Isolation and identification of a new dicoumarin from the roots of *Daphne genkwa*[J]. 药学学报, 2004, 39(12): 990-992.
- [5] 李玲芝,宋少江,高品一. 芫花的化学成分及药理作用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(9): 587-592.
- [6] 魏志文,高晓雯,郑维发. 芫花根总黄酮抗肿瘤活性研究[J]. 解放军药学学报, 2008, 24(2): 116-120.
- [7] 张恒基,柏新富,刘林德. 芫花愈伤组织的分化与植株再生[J]. 林业科技, 2009, 34(4): 78-81.
- [8] 王从彦,李晓慧,胡颖,等. SRAP 分子标记分析芫花遗传多样性[J]. 河南科学, 2008, 26(5): 554-556.
- [9] 万少侠,李慧丽,雷超群,等. 野生芫花植物防治天牛试验[J]. 现代农业科技, 2009(8): 78, 80.
- [10] 刘雪莲,秦佳梅,刘丽娟. 培养条件对返魂草花粉离体萌发的影响[J]. 北方园艺, 2009(12): 242-243.
- [11] 刘炳仑. 我国瑞香科(Thymelaeaceae)植物的花粉形态[J]. 植物研究, 1984, 4(2): 87-102.
- [12] 张亚利,田振坤,刘燕. 二乔玉兰花粉贮存条件的比较研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2006, 14(4): 318-320.
- [13] 张丽娜. 百合属植物花粉形态性状及生活力的研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学园艺学院, 2007: 26.

(责任编辑:佟金凤)