

# 甘草花粉超微鉴定及花粉活力、柱头可受性荧光显微镜观察

马春英<sup>1</sup>, 屈平<sup>2</sup>, 王文全<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>河北农业大学农学院/河北省作物生长调控重点实验室, 保定 071001;

<sup>2</sup>河北农业大学生命学院, 保定 071001; <sup>3</sup>北京中医药大学中药学院/中药材规范化生产教育部工程研究中心, 北京 100102)

**摘要:**对甘草的有性生殖特性进行了研究,利用扫描电子显微镜对乌拉尔甘草、光果甘草和胀果甘草花粉的超微结构进行观察,利用荧光显微镜确定乌拉尔甘草的授粉方式、花粉生活力和柱头活性以及授粉后受精时间。结果表明,花粉超微结构为甘草的鉴别提供了一定的形态学依据;甘草的授粉方式属于闭花受精;花粉生活力在每天 12:00 时最强,去雄后超过 4d 的柱头已经不具备接受花粉的能力;对授粉后不同时间的雌蕊进行研究得出授粉后 6h 花粉管进入胚珠进行受精。

**关键词:**甘草;花粉活力;柱头可受性;荧光显微镜

## Identification of Pollen Ultrastructure and Fluorescence Microscope Observation of Pollen Viability and Stigma Activity of Liquorice

MA Chun-ying<sup>1</sup>, QU Ping<sup>2</sup>, WANG Wen-quan<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Regulation and Control of Crop Growth of Hebei Province/College of Agronomy, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001; <sup>2</sup> School of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001; <sup>3</sup> Engineering Research Center for Chinese Medicine Standardized Production of Educational Ministry/School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102)

**Abstract:** The ultrastructure of the pollen in the *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., *G. glabra* L. and *G. inflata* Batal. were observed by the scanning electron microscope (SEM). Pollination way, pollen viability stigma activity and the fertilization time ascertainment after pollination were observed by the fluorescence microscope. The results showed that the study on the ultrastructure of pollen offered certain morphology basis for the discrimination of the liquorice. The pollination way of the liquorice was cleistogamy. The pollen viability was the highest at 12:00 on daytime, and the stigma had no ability to accept the pollen exceeding four days after artificial emasculation. The pollen tube entered into the ovule to fertilize 6h after pollination when the fixed pistils were observed different time after pollination. In order to establish the correct strategy of seed selection and breeding of the liquorice in the future, the sexual reproduction properties of the liquorice was also studied.

**Key words:** Liquorice; Pollen viability; Stigma activity; Fluorescence microscope

中药材甘草是指豆科甘草属植物乌拉尔甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、胀果甘草 (*G. inflata* Batal.) 或光果甘草 (*G. glabra* L.) 的干燥根及根

茎<sup>[1]</sup>。中医有“十方九草”的说法,此处之“草”即为甘草。近些年来,随着国内外对甘草质量的要求越来越高,特别是有效成分含量,人工栽培甘草与野生

收稿日期:2010-09-03 修回日期:2011-01-08

基金项目:国家科技重大专项“重大新药创制”课题(2009ZX09308-002);河北省自然科学基金(C2009000583和C2007000692);河北省科技厅项目(07220209)

作者简介:马春英,博士,研究方向为药用植物资源培育。E-mail: bushbucker@126.com

通讯作者:王文全,教授,博士,研究方向为药用植物资源培育。E-mail: wwq57@126.com

甘草存在很大差距,有必要对甘草育种等方面进行深入研究。由于植物的生殖与植物的遗传、育种等有密切的关系,所以对甘草有性生殖特性的研究有利于开展甘草的遗传育种工作。前苏联的学者最早对甘草的胚珠和胚囊的发育进行了研究<sup>[2]</sup>,之后,蔡雪等<sup>[3]</sup>对甘草的胚胎学做了进一步研究。任茜<sup>[4]</sup>对甘草雌雄配子体的发生与发育进行了研究。苟克俭等<sup>[5-6]</sup>对甘草花丝的胚性愈伤组织以及花药培养中愈伤组织诱导进行了研究。系统地研究甘草的有性生殖特性对于甘草的遗传改良具有重要的指导意义,但到目前为止,该领域的研究和报道还仅限于对甘草的胚胎学及雌雄配子体方面的研究。本研究旨在从花粉形态、授粉方式、花粉生活力、柱头活性、授粉至受精所历时间等方面对甘草的有性生殖特性展开系统研究,为甘草遗传改良奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验地点与材料

试验地设在内蒙古杭锦旗北京中医药大学甘草试验基地,地处 $41^{\circ}10'N$ 、 $108^{\circ}27'E$ ,海拔1381m,年平均气温 $6.6^{\circ}C$ ,年降雨量277.2mm,年蒸发量2462.8mm。该区属典型的温带大陆性气候,干旱少雨,风沙大,蒸发量大,昼夜温差大,年日照时数3120h, $\geq 10^{\circ}C$ 的活动积温3000.8 $^{\circ}C$ ,年均相对湿度48%<sup>[7]</sup>。

甘草花粉超微结构鉴定所用材料为2001年移栽至内蒙古杭锦旗的乌拉尔甘草、光果甘草和胀果甘草。其他有性生殖特性方面所用乌拉尔甘草的试验材料为2001年秋季移栽的甘草种苗,面积约4000m<sup>2</sup>,2006年有部分植株开花结荚,2007年全部植株开花结荚。试验于2008年甘草开花盛期进行。所有试验材料均由北京中医药大学王文全教授鉴定。

### 1.2 测定项目及方法

**1.2.1 3种甘草花粉的扫描电镜观察** 将乌拉尔甘草、光果甘草和胀果甘草的花粉直接散布在贴有双面胶的样品台上,真空喷金镀膜后,在KYKY-2800型扫描电子显微镜上观察并照相。花粉大小为所观察50个花粉粒的平均值。

**1.2.2 乌拉尔甘草单花套袋的荧光显微镜观察** 选择20个花序,从每个花序中下部选一个未开放花,用镊子将其余花全部去掉,将其用硫酸纸袋紧紧套住,用曲别针别上,2d后将其放入FAA固定液

中,利用荧光显微镜观察其花粉萌发状态及花粉管进入子房状况。

**1.2.3 乌拉尔甘草花粉生活力的荧光显微镜观察** 一天当中在8:00、12:00和16:00分别选择合适花去雄后立即授予异株花粉;前一天下午去雄80个花,分别于第2天8:00、12:00和16:00授予异株花粉。

授粉后3~5d将花放入FAA固定液,用荧光显微镜观察固定材料柱头花粉管萌发情况,确定其是否能够完成授粉受精。

**1.2.4 柱头可受性的荧光显微镜观察** 在前一天下午去雄100个花,分别设置去雄后立即授粉、第2天上午授粉、第3天上午授粉、第4天上午授粉和第5天上午授粉各20个花。

授粉后3~5d将花放入FAA固定液,用荧光显微镜观察固定材料柱头花粉管萌发情况,确定其是否能够完成授粉和受精。

**1.2.5 荧光显微镜观察方法** 在王灶安<sup>[8]</sup>方法的基础上适当改动。①冲洗:将上述FAA固定的材料,用蒸馏水冲洗30min;②软化和透明:冲洗后的材料浸入8mol/L NaOH溶液中12h;③再冲洗:蒸馏水浸泡2h以上,中间经多次换水;④染色:将材料放于洁净的载玻片上,加1滴0.1%苯胺蓝染液(1mol/L K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>溶解)染色;⑤封片:盖上盖玻片,用镊子按压使材料展开,用滤纸吸去多余染液;⑥观察并摄影:将压片于Nikon eclipse E400荧光显微镜下进行观察,滤光片波段为330~380。

## 2 结果与分析

### 2.1 乌拉尔甘草、光果甘草和胀果甘草花粉的超微结构鉴定

结果显示乌拉尔甘草花粉粒大小较均匀,极面观为三角形,赤道面观呈扁球形,花粉粒萌发器官是三孔沟,有沟膜,花粉粒的沟间区表面穴状-细网状结构,极面的表面较光滑(图版I)。利用ImageJ软件对扫描电镜下的花粉进行了测量,乌拉尔甘草花粉大小为 $40.95\mu m \times 30.72\mu m$ ,光果甘草花粉大小为 $43.53\mu m \times 24.41\mu m$ ,胀果甘草花粉大小为 $43.15\mu m \times 21.05\mu m$ 。三者花粉超微结构的形态区别见表1。

### 2.2 乌拉尔甘草自花授粉的荧光显微镜观察

在花瓣紧紧包裹雌蕊,即没有外来花粉援助的情况下,自身的花粉粒能够在柱头上大量萌发,并能最终进入胚珠进行受精(图1)。

表1 甘草属3种甘草的花粉形态比较

Table 1 The comparison of pollen morphology among three kinds of liquorice

项目 Item	乌拉尔甘草 <i>G. uralensis</i> Fisch.	光果甘草 <i>G. glabra</i> L.	胀果甘草 <i>G. inflata</i> Batal.
花粉群 Pollen group	花粉单粒,花粉粒大小均匀	花粉单粒,花粉粒大小均匀	花粉单粒,花粉粒大小均匀
赤道面观 Equatorial view	扁球形	椭圆形或长球形	椭圆形或长球形
极面观 Polar view	三角形	三裂圆形	三裂圆三角形
萌发器官及表面纹饰 Germinal organ and surface decoration	三孔沟,有沟膜,沟间区表面穴状-细网状结构,极面的表面较光滑	三孔沟,有沟膜,沟间区表面穴状-细网状结构,极面的表面较光滑,具稀疏的穿孔结构	三孔沟,有沟膜,沟间区表面穴状-细网状结构,极面的表面较光滑,具稀疏的穿孔结构

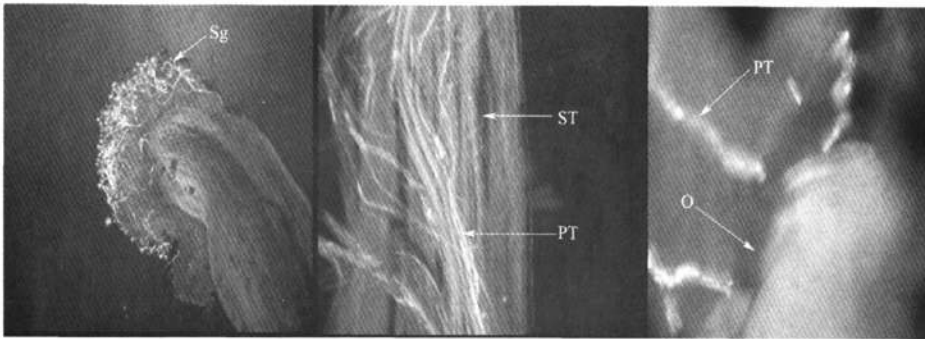


图1 花粉在柱头上大量萌发、花粉管进入花柱中部和花粉管进入胚珠

Fig. 1 A great deal of pollen germinating on the stigma, pollen tube entering into the middle part of the style and entering into the ovule

Sg: 柱头, stigma; ST: 花柱, style; PT: 花粉管, pollen tube; O: 胚珠, ovule

### 2.3 乌拉尔甘草花粉生活力的荧光显微镜观察

田间人工授粉后用荧光显微镜检测乌拉尔甘草花粉生活力(图版II:a~f),结果表明一天当中在12:00时即去即授的柱头上花粉萌发量最多(图版II:b),8:00和16:00都较少(图版II:a,c),前一天下午去雄,第2天也是以12:00授粉时柱头上花粉萌发较多(图版II:e),说明在一天当中以12:00时花粉的生活力最强。

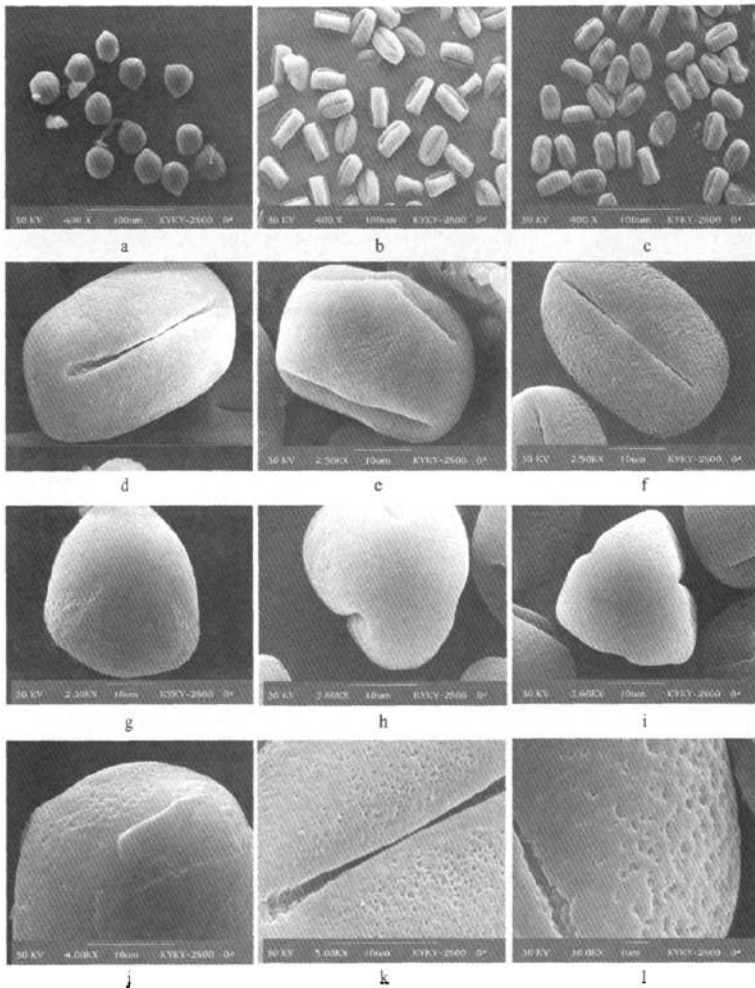
### 2.4 乌拉尔甘草柱头活性的荧光显微镜观察

田间人工授粉后用荧光显微镜检测乌拉尔甘草的柱头活性(图版II:g~k),结果显示前4天授粉的柱头上都可以看到花粉萌发和花粉管伸长的情况,而第5天授粉的柱头上明显没有见到花粉粒萌发(图版II:g~k),说明甘草花在去雄后超过4d柱头已丧失接受新鲜花粉的能力。

## 3 讨论

甘草属植物种类丰富,分布区域广阔,种间差

异较大,其主要药用活性成分甘草酸的含量差异也较大。虽然2005版中国药典中收录了乌拉尔甘草、光果甘草和胀果甘草可以作为药用,但三者之中,乌拉尔甘草的甘草酸含量最高<sup>[9]</sup>,应用最为广泛。所以,能否准确鉴定出乌拉尔甘草是甘草药材应用中的关键。花粉作为甘草有性生殖中的雄配子体,其形态是植物总体性状中较为重要的一部分,在进化上属于较为保守的性状,可作为鉴定种或品种的重要依据之一<sup>[10]</sup>。本研究对中国药典收录的3种甘草的花粉超微结构研究表明,光果甘草和胀果甘草的花粉大小相似,而乌拉尔甘草的花粉小于光果和胀果甘草;光果甘草和胀果甘草的赤道面、极面以及萌发器官及表面纹饰观也极为相似,而乌拉尔甘草则分别表现出扁球形、三角形以及不具穿孔结构等不同特征。本试验初次观察了乌拉尔甘草、光果甘草和胀果甘草花粉的超微结构,为乌拉尔甘草的鉴别提供了一定的形态学依据。



图版 I 3 种药用甘草花粉粒形态

## Plate 1 Pollen morphology of three medicinal liquorice

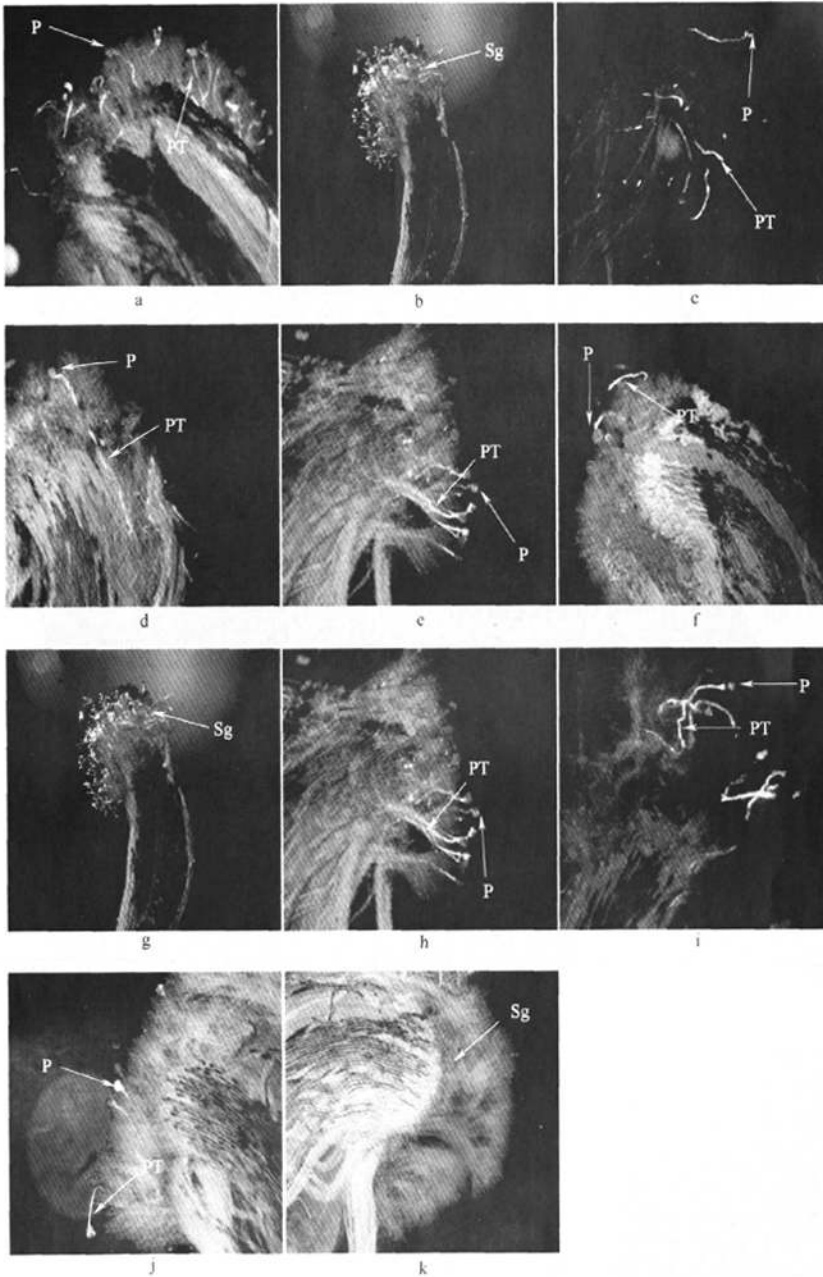
图版说明:a:乌拉尔甘草花粉群体;b:光果甘草花粉群体;c:胀果甘草花粉群体;d:光果甘草赤道面观;e,f:胀果甘草赤道面观;g:乌拉尔甘草极面观;h:光果甘草极面观;i:胀果甘草极面观;j:乌拉尔甘草萌发器官和表面纹饰;k:光果甘草萌发器官和表面纹饰;l:胀果甘草萌发器官和表面纹饰

Explanation:a:pollen population of *G. uralensis*;b:pollen population of *G. glabra*;c:pollen population of *G. inflata bataol*;d:equatorial view of *G. glabra*;e,f:equatorial view of *G. inflata bataol*;g:polar view of *G. uralensis*;h:polar view of *G. glabra*;i:polar view of *G. inflata bataol*;j:germination organ and surface ornamentation of *G. uralensis*;k:germination organ and surface ornamentation of *G. glabra*;l:germination organ and surface ornamentation of *G. inflata bataol*

马春英等<sup>[11]</sup>观察乌拉尔甘草的花部特征时发现,甘草在花冠抽出花萼一定距离、但还没有开放时就已经完成散粉,说明其具备闭花授粉的条件。但张新玲等<sup>[12]</sup>曾提到甘草自交不亲和。鉴于以上矛盾,本研究将花瓣紧紧包裹雌雄蕊的未开放单花套袋,用荧光显微镜观察其柱头上的花粉萌发状况来进一步确定甘草的授粉方式。结果表明,在甘草花瓣紧紧包裹雌雄蕊,即没有外来花粉援助的情况下,自身的花粉粒能够最终进入胚珠进行受精,进一步

证明了甘草的授粉方式属于闭花受精。

花粉生活力的测定有染色法、离体萌发法等,柱头活性的测定有联苯胺-过氧化氢法、苏丹Ⅲ染色法等。检查花粉生活力和柱头活性最直接的方法是统计人工授粉结实率<sup>[13]</sup>。但是甘草人工授粉后可能会受到外界的干扰影响结实率统计的准确性,本试验将甘草授粉后3~5d的雌蕊放入FAA固定液,在实验室内利用荧光显微镜观察柱头上花粉萌发的数量多少来确定其花粉生活力和柱头活性。魏建和



图版 II 甘草花粉生活力和柱头活性的荧光显微镜观察

Plate II The fluorescence microscope observation of the pollen viability and stigma activity of liquorice

图版说明:P:花粉粒,pollen;PT:花粉管,pollen tube;Sg:柱头,stigma;st:花柱,style;ov:胚珠,ovule;

a:即去即授 8:00 柱头花粉萌发;b,g:即去即授 12:00 柱头花粉萌发;c:即去即授 16:00 柱头花粉萌发;d:去雄后第 2 天 9:00 授粉;e,h:去雄后第 2 天 12:00 授粉;f:去雄后第 2 天 16:00 授粉;i:去雄后第 3 天上午授粉;j:去雄后第 4 天上午授粉;k:去雄后第 5 天上午授粉

Explanation:a:pollen germination in the stigma at 8:00 pollination after emasulation;b,g:pollen germination in the stigma at 12:00 pollination after emasulation;c:pollen germination in the stigma at 16:00 pollination after emasulation;d:pollination at 9:00 the next day after emasulation;e,h:pollination at 12:00 the next day after emasulation;f:pollination at 16:00 the next day after emasulation;i:pollination at 12:00 the third day after emasulation;j:pollination at 12:00 the fourth day after emasulation;k:pollination at 12:00 the fifth day after emasulation

等<sup>[14]</sup>曾利用荧光显微镜对桔梗(*Platycodon grandiflorum*(Jacq.)A. DC.)的花粉管萌发进行观察,并讨论了利用荧光显微镜观察花粉管萌发的优点,说明采用荧光显微镜能快速测定植物授粉的亲和性。本研究结果也表明这种方法能够准确判断甘草的花粉生活力和柱头活性。

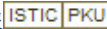
研究表明在 12:00 时即去即授的柱头上花粉萌发量最多,前一天下午去雄,第 2 天也是以 12:00 授粉时柱头上花粉萌发较多,但是萌发数目要远少于该时间即去即授者,说明在一天当中以 12:00 时花粉的生活力最强。如果采用杂交方法对甘草进行遗传改良,可以采用在每天 12:00 时选择新鲜花粉对刚去雄的雌蕊进行授粉。根据笔者之前的研究<sup>[11]</sup>,采集新鲜花粉要选取花萼抽出花瓣一定距离但还没有开放的花,这样的花在田间随时可以找到,能够保证甘草花在去雄后立即授粉的需要。对柱头活性的检测结果表明在去雄后第 5 天授粉时虽然花粉仍然是新鲜花粉,但是柱头已经没有活性,说明甘草花在去雄后超过 4d 时柱头不能再接受新鲜花粉进行杂交。

致谢:中国科学院南京地质古生物研究所毛礼米博士指导甘草花粉超微结构及形态描述,特致诚挚的感谢。

#### 参考文献

- [1] 中华人民共和国药典:一部[M].北京:化学工业出版社,2005
- [2] Normatov B A, Ashurmetov A A. Features of seed bud and embryo sac development in *Glycyrrhiza aspera*[J]. Uzb Bio Zh, 1980, 3: 35-38
- [3] 蔡雪,申家恒.甘草胚胎学研究[J].植物学报,1992,34(9): 676-681
- [4] 任茜.甘草雌雄配子体的生长与发育[J].中药材,1993,16(1):3-5
- [5] 苟克俭,任茜.甘草花丝的胚性愈伤组织诱导及其体细胞胚的发生[J].西北农业大学学报,1993,21(3):107-109
- [6] 苟克俭,任茜.甘草花药培养中愈伤组织诱导和芽再生植株[J].西北农业大学学报,1993,21(4):32-35
- [7] 唐晓敏.水分和盐分胁迫对甘草药材质量的影响[D].北京:北京中医药大学,2008
- [8] 王灶安.植物显微技术[M].北京:中国农业出版社,1992: 87-88
- [9] 曾路,楼之岑,张如意,等.国产甘草的质量评价[J].药学学报,1991,26(10):788-793
- [10] 牛立新,张延龙.中国野生葡萄花粉形态学研究[J].园艺学报,2000,27(5):361-363
- [11] 马春英,王文全,张学静,等.乌拉尔甘草花部特征和开花结实特性的研究[J].植物遗传资源学报,2009,10(2):295-299
- [12] 张新玲,李学禹,魏灵基,等.新疆甘草属的种间杂交[J].西北植物学报,1998,18(1):132-135
- [13] 王艳哲,崔彦宏,张丽华.玉米花粉生活力研究进展[J].玉米科学,2008,16(5):144-146
- [14] 魏建和,马凤杰,黄璐琦,等.桔梗花粉管萌发的荧光显微镜观察[J].中国中药杂志,2007,32(16):1625-1627

# 甘草花粉超微鉴定及花粉活力、柱头可受性荧光显微镜观察

作者: [马春英](#), [屈平](#), [王文全](#), [MA Chun-ying](#), [QU Ping](#), [WANG Wen-quan](#)  
作者单位: [马春英, MA Chun-ying \(河北农业大学农学院/河北省作物生长调控重点实验室, 保定, 071001\)](#),  
[屈平, QU Ping \(河北农业大学生命学院, 保定, 071001\)](#), [王文全, WANG Wen-quan \(北京中医药大学中药学院/中药材规范化生产教育部工程研究中心, 北京, 100102\)](#)  
刊名: [植物遗传资源学报](#)   
英文刊名: [JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES](#)  
年, 卷(期): 2011, 12 (3)

## 参考文献(14条)

1. [魏建和; 马凤杰; 黄璐琦](#) [桔梗花粉管萌发的荧光显微镜观察](#) 2007 (16)
2. [王艳哲; 崔彦宏; 张丽华](#) [玉米花粉生活力研究进展](#) 2008 (05)
3. [张新玲; 李学禹; 魏灵基](#) [新疆甘草属的种间杂交](#) 1998 (01)
4. [马春英; 王文全; 张学静](#) [乌拉尔甘草花部特征和开花结英特性的研究](#) 2009 (02)
5. [牛立新; 张延龙](#) [中国野生葡萄花粉形态学研究](#) 2000 (05)
6. [曾路; 楼之岑; 张如意](#) [国产甘草的质量评价](#) 1991 (10)
7. [王灶安](#) [植物显微技术](#) 1992
8. [唐晓敏](#) [水分和盐分胁迫对甘草药材质量的影响](#) 2008
9. [苟克俭; 任茜](#) [甘草花药培养中愈伤组织诱导和芽再生植株](#) 1993 (04)
10. [苟克俭; 任茜](#) [甘草花丝的胚性愈伤组织诱导及其体细胞胚的发生](#) 1993 (03)
11. [任茜](#) [甘草雌雄配子体的生长与发育](#) 1993 (01)
12. [蔡雪; 申家恒](#) [甘草胚胎学研究](#) 1992 (09)
13. [Normatov B A; Ashurmetov A A](#) [Features of seed bud and embryo sac development in Glycyrrhiza aspera](#) 1980
14. [中华人民共和国药典: 一部](#) 2005

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zwyczyxb201103010.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201103010.aspx)