

# 乌拉尔甘草开花特性研究<sup>△</sup>

高素芳\*,张延红,陈红刚,李金田,杜 骏<sup>#</sup>(甘肃中医药大学,兰州 730000)

中图分类号 R931.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)13-1775-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.13.13

**摘要** 目的:研究甘草开花规律,为甘草杂交育种提供理论依据。方法:观察甘草开花顺序、花的外部形态与内部结构的相关性、一日开花高峰期和朵花开放动态,同时测定花粉-胚珠比(P/O)以及开花不同时期的花粉生活力。结果:甘草主茎上的花序先开,开放顺序为从下至上,开至3~5个花序时侧枝上的花序开始开放,开放顺序亦为从下至上。旗瓣开缝大小与小花的散粉情况密切相关。10:00—13:00和15:00—18:00时间段是甘草的一日开花高峰期。朵花从开放至合拢约需32 h,至萎蔫约需35 h。P/O=260.46,为兼性异交。旗瓣张开2~5 mm时花粉生活力最高。结论:该研究结果可指导甘草有性杂交育种,为甘草的新品种培育奠定良好的理论基础。

**关键词** 甘草;开花顺序;一日开花动态;朵花开放动态;花粉-胚珠比

## Study on the Flowering Characteristics of *Glycyrrhiza uralensis*

GAO Sufang, ZHANG Yanhong, CHEN Honggang, LI Jintian, DU Tao (Gansu University of TCM, Lanzhou 730000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the regularity of *Glycyrrhiza uralensis*, and to provide theoretic basis for cross breeding of *G. uralensis*. METHODS: The flowering sequence of *G. uralensis* was observed, as well as the correlation of flower external morphology and internal structure, flowering rush hour a day, flower blooming dynamics. At the same time, pollen-ovule ratio (P/O) and pollen viability at different flowering periods were determined. RESULTS: Flowers on main stem firstly bloomed, the opening order was bottom-up, and when three to five flowers bloomed, the lateral branch began to bloom, which order was also bottom-up. There was a closely correlation between the situation of pollen shedding and the size of banner blooming. 10:00-13:00 and 15:00-18:00 were flowering rush hour. A flower from bloom to closed needed about 32 hours, wilting about after 35 hours. P/O=260.46, it was facultative xenogamy. When banner bloomed 2-5 mm, the pollen had the highest life force. CONCLUSIONS: The results can guide the sexual hybridization breeding of *G. uralensis*, and lay a good theoretical basis for its new varieties breeding.

**KEYWORDS** *Glycyrrhiza uralensis*; Flowering sequence; Flowering rush hour a day; Flower blooming dynamics; Pollen-ovule ratio

乌拉尔甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)为多年生豆科草本植物,在我国具有悠久的药用历史,是中医常用的重要药材之一<sup>[1]</sup>。随着以甘草为原料的中药保健品、中成药的不断开发利用以及在化妆品、食品、烟草等行业的拓展,国内外市场对甘草的需求量大增,使甘草野生资源急剧下降<sup>[2]</sup>。在药典收录的3种甘草中,乌拉尔甘草是主要的栽培种,提高栽培技术及选育优良品种已成为甘草资源培育的重要途径<sup>[3]</sup>。而明确植物的有性生殖方式是开展植物育种研究的前提和基础。甘草作为常用中药,研究多集中于资源开发、药理、化学等方面<sup>[4-5]</sup>,对其有性生殖规律等基础研究较少。马春英等<sup>[2]</sup>研究发现,甘草在花冠抽出花萼一定距离时(小花开放前)就已经散粉完毕,说明其具备闭花授粉的条件;而且花药散粉后柱头周围产生了绒毛状的突起,这可以作为完成授粉的标志<sup>[3]</sup>。闻婧<sup>[6]</sup>研究认为,甘草多采用闭花授粉。但张新玲等<sup>[7]</sup>研究发现,甘草有自交不亲和现象。因此,甘草的授粉方式还有待于进一步研究。本研究以乌拉尔甘草为材料,研究其开花习性,以期揭示

<sup>△</sup>基金项目:国家中医药管理局基金资助项目——国家基本药物所需中药材种子种苗繁育基地建设;甘肃省普通中医药科研立项资助课题(No.GZK-2011-63)

\*讲师,硕士。研究方向:药用植物资源开发与利用的教学和研究。电话:0931-8765393。E-mail:gsf223@163.com

<sup>#</sup>通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:药用植物育种的的教学和研究。电话:0931-8765393。E-mail:gszlzdt@163.com

甘草开花规律,为甘草杂交育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料来自甘肃省陇西县首阳中药材科技示范园的甘草基地,2009年种苗移栽,2012年甘草植株开始开花结实。试验于2013年6—7月甘草开花期进行。

### 1.2 方法

1.2.1 甘草花序着生部位与开花顺序 观察甘草花序着生部位,每花序小花数目和开花顺序等。

1.2.2 花的外部形态与内部结构的相关性 解剖不同发育阶段的小花,记录花蕾的发育时期,花瓣和萼片的长度、旗瓣开缝大小、花药的散粉情况、花药与柱头的高度和相对位置等。观察测量各发育阶段的小花6~8朵。

1.2.3 一日开花动态 选取12株花序上大部分小花处于花蕾期的甘草植株,于每天6:00—20:00之间每隔1 h统计新开小花数。用记号笔标记已开小花,连续观察3 d,记录开花的日动态,并得出一日开花高峰期。开花标准为小花旗瓣外翻,露出里面的花瓣。

1.2.4 朵花开放动态 选取同一部位,花大小和状态相同的小花10朵,每隔1 h观察小花状态变化,了解朵花开放动态。

1.2.5 花粉-胚珠比(P/O)的估算 选取花药尚未开裂的发育进程比较一致的小花30朵,用福尔马林-醋酸-乙醇(FAA)固定液固定。取单花的全部花药用盐酸水解释放花粉,在显微镜

下观察并用血球计数板计数的方法计数,统计花粉量(单花花粉量=总花粉量/单花数),重复10次,取平均值。取心皮解剖,计数胚珠数,重复10次,取平均值。 $P/O$ =平均单花花粉量/平均胚珠数。按照Cruden的标准<sup>[8]</sup>, $P/O$ 为2.7~5.4时,其繁育系统为闭花受精; $P/O$ 为18.1~39.0时,繁育系统为专性自交; $P/O$ 为31.9~396.0时,繁育系统为兼性自交; $P/O$ 为244.7~2 588.0时,繁育系统为兼性异交; $P/O$ 为2 108.0~195 525.0时,繁育系统为专性异交。

1.2.6 开放不同状态花朵的生活力的测定 采用2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)法<sup>[9]</sup>。将花开不同状态的甘草花粉置于洁净的载玻片上,加2滴0.5%TTC溶液搅匀后盖上盖玻片,于35℃恒温箱中保温15~20 min后镜检。凡被染为红色的花粉判定为有生活力的,无色者判定为没有生活力。花粉生活力指的是有生活力的花粉占总花粉的百分比。每个处理3朵小花,每朵小花重复计数50粒。每个处理指的是对处于不同开花状态的甘草花粉进行染色。

## 2 结果与分析

### 2.1 甘草花序与开花顺序观察

甘草为总状花序蝶形花,叶互生。同一植株上的甘草花序自下由上形成花序,若无侧枝,主茎上9~10个叶腋以上开始着生花序;若有侧枝,侧枝起始于植株基部叶腋处,侧枝上4~6叶腋以上开始着生二级花序。主茎上的花序先开,花序开放顺序为从下至上;开至3~5个花序时侧枝上的花序开始开放,开放顺序仍为从下至上,每个花序上小花的开放顺序为由下至上。当一个花序开至中上部后,离其最近的上部花序开始开放。侧枝上着生的花序数与植株的生长状态相关,长势较好的侧枝花序多,但侧枝上的花序数量和小花数明显少于主茎上的花序。侧枝最下端的花序与主茎最下端的花序数量相比较,主茎花序数平均为13个,侧枝花序数平均为5.3个。主茎上每个花序上的小花数,从下至上逐渐减少,多则24朵,少则13朵。

### 2.2 花的外部形态与内部发育的相关性

通过解剖不同发育阶段的小花,记录花蕾的发育时期、花药与柱头的高度和相对位置、花药的散粉情况,测量花瓣和萼片的长度、旗瓣开缝大小,研究甘草小花的外部形态与内部发育的相关性,结果见表1。

表1 花的外部形态与内部发育的相关性

Tab 1 The correlation of external morphology and internal development

花的状态	花长, cm	萼片长, cm	旗瓣开缝, mm	雌蕊长, cm	雄蕊长, cm	空间位置
花瓣未张开,深紫色,萼片绿色	1.53	1.10	1.2	1.05	1.25	雌蕊高于雄蕊
花各部分颜色变浅,有散粉迹象	2.03	1.13	2.0	1.18	1.23	基本相平
花瓣浅紫色,翼瓣开1 mm,正常散粉	2.27	1.37	5.0	1.37	1.22	雌蕊高于雄蕊
翼瓣张开 $\geq 2$ mm,花粉量较少	2.40	1.30	$>5.0$	1.40	1.23	雌蕊高于雄蕊
旗瓣外翻,翼瓣张开3 mm	2.40	1.27	$>5.0$	1.38	1.20	雌蕊高于雄蕊
龙骨瓣张开,花粉量很少	2.45	1.35	$>5.0$	1.40	1.35	基本相平
花开始萎蔫,无花粉	2.33	1.30	$>5.0$	1.37	1.30	基本相平

由表1可见,发育早期的甘草小花,花瓣呈深紫色,花瓣各部分未张开,萼片绿色。当花长1.53 cm时,萼片长1.1 cm,此时旗瓣的开缝大小为1.2 mm(旗瓣位于小花的最外层,包裹其他花瓣),雌蕊高于雄蕊。随着小花的进一步生长,小花各部分颜色变浅,萼片长无明显变化。花长增加至2.03 cm,旗瓣开缝增大至2 mm,此时雌蕊和雄蕊基本相平,花药有散粉迹象,说明此时甘草具备自花授粉的条件。待小花长至2.27 cm,萼

片长1.37 cm,旗瓣开缝5 mm,翼瓣张开1 mm,此时柱头高于雄蕊,花药正常散粉。在花药有散粉迹象到正常大量散粉的过程中,雌蕊和雄蕊从基本相平逐渐转变为雌蕊高于雄蕊,说明在雌蕊伸长的过程中花药进行散粉。因此,甘草应该存在一定程度的自花授粉。但此时由于旗瓣未外翻,整个花朵包裹较紧密,在这种情况下风媒传粉的可能性较小,只能依靠昆虫传粉(在研究中也观察到有蜂类、蝶类等昆虫访花)。翼瓣张开后小花的大小基本不再增加,雌蕊高度几乎不变,雄蕊还进一步伸长。之后花进一步伸长,旗瓣和翼瓣开缝进一步变大,雌蕊仍高于雄蕊,但花粉量较少。此后花和萼片长度变化不明显,接着先是旗瓣外翻,之后龙骨瓣张开,花粉量越来越少,但雌蕊和雄蕊高度又持平,最后花萎蔫、无花粉。旗瓣开缝大小与小花的散粉情况密切相关,即旗瓣开缝小于2 mm时,花药未散粉;2~5 mm之间时正常散粉;大于5 mm时花粉量很少。因此,可根据旗瓣开缝大小判断小花散粉情况。

### 2.3 朵花开放动态

通过连续的观察和测量发现,甘草小花从旗瓣开小缝(约2 mm)到开大缝(5 mm)约需24 h,此时花药正在散粉;从旗瓣开大缝到外翻约需2~3 h;从旗瓣张开到翼瓣开放约需4~6 h;翼瓣张开到龙骨瓣张开约需2 h。朵花从开放至合拢约需32 h,小花萎蔫约需35 h。因此,有性杂交时应在旗瓣开小缝(2 mm)时去雄,在24 h内授粉,套袋,35 h后可去掉套袋。

### 2.4 一日开花高峰期

选取12株花序上大部分小花处于花蕾期的甘草植株,于每天6:00~20:00之间每隔1 h统计新开花数。一日开花动态与温度和湿度之间的关系见图1。

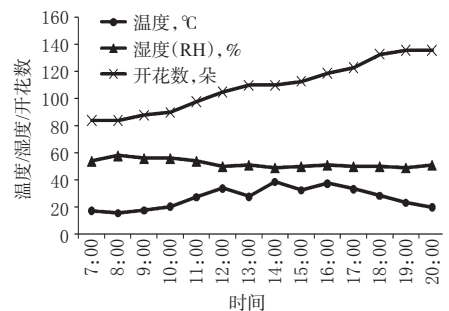


图1 一日开花动态与温度和湿度之间的关系

Fig 1 The relationship between flowering dynamic a day with the temperature and humidity

由图1可见,一日内湿度变化不大,说明在一定的湿度范围内,湿度对开花的影响不明显。温度在一天之内呈三峰曲线变化,在7:00~8:00之间温度较低,没有新开的鲜花;9:00~10:00之间温度缓慢上升,逐渐有鲜花开放,但开花数增加不多;10:00~13:00之间温度上升较快,开花数明显增多,是开花的高峰期;13:00~15:00之间温度持续较高,但开花数增加并不多,可能高温和高光强度并不利于甘草开花;15:00~18:00之间开花数增加较快,是开花的又一高峰期;19:00~20:00再无新的鲜花开放。因此,10:00~13:00和15:00~18:00是开花的高峰期。早晨随着时间的推移,温度和光照强度逐渐增加,开花数增多;持续的高温和高光强度,不再有新的鲜花开放;温度适当降低、光强度减弱时,开花数又增多。由此推断,一般情况下,甘草花朵的开放需要较高的温度和较强的光照条件,湿度对花朵开放的影响不大。

### 2.5 P/O

选取花药尚未开裂的发育进程比较一致的小花30朵,估算P/O。检测结果表明,朵花胚珠数平均为8.7个,朵花花粉数平均为2266个,P/O=260.46。按照Cruden的标准,当P/O为244.7~2588.0时,繁育系统为兼性异交。

## 2.6 开花不同状态花粉生活力测定

测定了不同开放状态花朵的花粉生活力,结果见表2。

表2 开花状态与花粉生活力之间的关系

Tab 2 The relationship between the state of flowering and pollen viability

花的状态	花粉生活力,%
萼片完全包裹小花	4.10±0.20*
外露花瓣和萼片等长	6.30±0.47*
旗瓣开缝2 mm	82.80±6.25
旗瓣开缝5 mm	82.20±0.92
翼瓣张开≥2 mm	29.50±1.17*
龙骨瓣张开	12.40±1.85*

注:与旗瓣开缝2 mm比较,\* $P<0.05$

Note: vs. flag slotted 2 mm,\* $P<0.05$

由表2可见,当萼片完全包裹花朵时,花粉生活力很低,仅为(4.10±0.20)%;当花瓣(露出萼片的部分)和萼片等长时,花粉生活力仍然很低,为(6.30±0.47)%;当花朵腹部开小缝时(即包裹的旗瓣开始张开),花粉生活力最高,为(82.80±6.25)%;旗瓣开放时(旗瓣开缝5 mm),花粉生活力为(82.20±0.92)%;翼瓣开放时,花粉生活力显著降低,为(29.50±1.17)%;待龙骨瓣开放时,仅为(12.40±1.85)%。与表1结果相对比可知,旗瓣开缝2~5 mm时,雌蕊和雄蕊由高度相平,逐渐转变为雌蕊高于雄蕊,同时花药正常散粉、花粉量最多,此时花粉的生活力也最高。因此,该试验结果亦表明甘草存在一定程度的自花授粉。

## 3 讨论

### 3.1 一日开花高峰期的确定

本试验首次研究了温度和湿度与甘草一日开花高峰期之间的关系。结果明确了10:00—13:00和15:00—18:00是甘草的一日开花高峰期,这与谢佳颖等<sup>[6]</sup>的研究结果相似。不同的是,本研究发现13:00—15:00很少有花朵开放,此时间恰好是温度高、光照强的时候。该研究结果有助于有目的地开展杂交育种工作。

### 3.2 旗瓣开缝大小与有性杂交

本研究首次以旗瓣开缝大小为主要形态指标,结合其他花瓣的变化,详细地记录了小花开放的动态和所需时间。这一研究结果为杂交育种工作者提供了理论依据。甘草小花从旗瓣开小缝(约2 mm)到开大缝(5 mm)约需24 h,此时花药正在散粉。因此,可根据旗瓣开缝大小判断小花散粉情况。有性杂交时应在旗瓣开小缝(2 mm)时去雄,在24 h内授粉,套袋。小花萎蔫约需35 h,因此,35 h后可去掉套袋。谢佳颖等<sup>[6]</sup>研究发现,从旗瓣开始张开到小花完全开放需要几个小时到1天的时间,这与本研究的结果相似。

### 3.3 花粉生活力持续时间

本研究表明,甘草小花从旗瓣开小缝(约2 mm)到开大缝(5 mm)约需24 h,此时花药正在散粉,花粉生活力也最高,朵花从开放(旗瓣开大缝)至合拢约需32 h,小花萎蔫约需35 h。马春英等<sup>[10]</sup>研究发现,从旗瓣开始张开到小花完全开放需要几

个小时到1天的时间,这与本研究的结果相似。但李秀凤<sup>[11]</sup>的研究结果表明,甘草花粉生活力在散粉当天最高为94%;散粉后第2天和第4天,花粉生活力虽有所下降,但都维持在90%以上;之后则迅速下降,到第16天,花粉全部死亡,生活力完全丧失<sup>[11]</sup>。这与本研究的结果小花从开放到萎蔫仅需35 h,此时几乎已无花粉相矛盾。

### 3.4 甘草的授粉习性

本研究中花的外部形态与内部发育的相关性以及开花状态与花粉生活力之间的关系表明,甘草存在一定程度的自花授粉。同时也观察到有蜂类、蝶类等昆虫访花。从P/O=260.46的测定结果来看,甘草也存在一定程度的异花授粉。马春英等<sup>[10]</sup>研究也认为,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,进一步证明了甘草存在闭花受精。李秀凤<sup>[11]</sup>通过不同方式的授粉处理后发现,甘草存在自交亲和,但异株授粉结实率更高,为兼性异交类型植物。扩增片段长度多态性(AFLP)分子标记进一步明确甘草基因型具有一定的杂合性,表明甘草的基因型具有一定的杂合性而不是完全的纯合体。综合以上几方面的研究结果以及相关研究报道,说明甘草的授粉方式既有自花授粉,又有异花授粉,属兼性异交类型植物。

综上所述,该研究结果可指导甘草有性杂交育种,为甘草的新品种培育奠定良好的理论基础。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:86-87.
- [2] 马春英,王文全,张学静,等. 乌拉尔甘草花部特征和开花结荚特性的研究[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(2):295.
- [3] 代少山. 乌拉尔甘草种质资源与药材质量研究[D]. 保定:河北农业大学,2011:7-8.
- [4] 唐丽琴,张善堂,刘圣,等. HPLC法测定不同来源甘草中甘草酸的含量[J]. 中国药房,2010,21(39):3700.
- [5] 谢佳颖,杨立国,夏伟军,等. 甘草药材HPLC指纹图谱研究[J]. 云南中医学院学报,2015,38(5):32.
- [6] 闻婧. 不同起源乌拉尔甘草生殖生态学研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2004:24-27.
- [7] 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.
- [8] Cruden RW. Pollen ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants[J]. *Evolution*, 1977,31(1):32.
- [9] 陈学森. 植物育种学实验[M]. 北京:高等教育出版社,2004:19-22.
- [10] 马春英,屈平,王文全. 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[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(3):396.
- [11] 李秀凤. 甘草开花特性及传粉生物学研究[D]. 保定:河北农业大学,2010:22-23.

(收稿日期:2015-10-02 修回日期:2016-02-01)

(编辑:余庆华)