

doi:10.16779/j.cnki.1003-5508.2017.02.003

# 北川驴蹄草 (*Caltha dysosmoides*) 花部特征研究

别鹏飞<sup>1</sup>, 谢欢欢<sup>1</sup>, 胡进耀<sup>1,2\*</sup>, 朱云东<sup>3</sup>

(1. 绵阳师范学院, 四川 绵阳 621000; 2. 绵阳蜀创农业科技有限公司, 四川 绵阳 621000;  
3. 北川林业局, 四川 北川 622750)

**摘要:**北川驴蹄草 (*Caltha dysosmoides* Tao Zhang et al) 是2016年新命名的物种(四川特有), 为保护利用这一新种, 急需研究其生殖生物学特征。本研究于不同种群中选取50株进行标记, 观察其花部特征, 测试花粉活力以及柱头可授性。采用TTC法测定花粉活力; 采用液体培养基对北川驴蹄草花粉进行离体培养; 采用联苯胺-过氧化氢法测定柱头可授性(直到无活力为止)。实验结果表明: 在自然条件下, 北川驴蹄草4月~5月开花, 单花花期一般为2d。雄蕊短于雌蕊, 花药紧贴花柱外侧, 花药与柱头相距约3mm, 在整个花朵开放的过程中雌蕊和雄蕊的相对位置不变; 花粉活力早上明显低于下午, 且于花后1h~4h内增长较快, 4h之后花粉活力增长较慢; 柱头具有可授性, 于花后3h时柱头可授性相对较强。

**关键词:**北川驴蹄草; 花部特征; 花粉活性; 花粉萌发; 柱头可授性

中图分类号: S722.8 文献标识码: A 文章编号: 1003-5508(2017)02-0013-04

## Pollen Viability, Stigma Receptivity and Floral Characteristics Study of *Caltha dysosmoides*

BIE Peng-fei<sup>1</sup> XIE Huan-huan<sup>1</sup> HU Jin-yao<sup>1,2\*</sup> ZHU Yun-dong<sup>3</sup>

(1. Mianyang Normal University, Mianyang 621000; 2. Mianyang Shu Chuang Agricultural Science and Technology Co. Ltd, Mianyang 621000; 3. Beichuan Forestry Bureau, Beichuan 622750, China)

**Abstract:** *Caltha dysosmoides* is a newly named species in 2016 (specific to Sichuan). For the protection and use of this new species, the urgent need is to study their reproductive biology. In this paper, 50 strains were selected from different populations to observe their floral characteristics, pollen viability and stigma receptivity. The pollen viability was measured by TTC method, and the pollen culture of *Caltha* was cultured in liquid medium, and the stigma receptivity was determined by benzidine hydrogen peroxide (until it was inactive). The results of the investigation showed that under natural conditions, the *Caltha* bloomed from April to May, and the flowering period of one flower is generally 2 days. Stamens were shorter than pistil; Anthers were close to the outer side of the stilus with a distance of about 3 mm; In the whole process of flower opening, the relative position of the pistil and stamen were invariant; In the morning, pollen viability was significantly lower than in the afternoon, and increased rapidly in 1~4 hours after anthesis, after 4 hours, the pollen activity increased slowly. The stigma could be granted, and it would be relatively strong at 3 hours after anthesis.

**Key words:** *Caltha dysosmoides* Tao Zhang et al, Floral characteristics, Pollen viability, Pollen germination, Stigma receptivity

收稿日期: 2017-01-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170319); 片口保护区2014年省级财政林业自然保护区建设项目(2015)29号。

作者简介: 别鹏飞(1990-), 男, 硕士研究生, 绵阳师范学院环境工程专业。

通讯作者: 胡进耀(1978-), 男, 教授, 研究方向: 生态系统安全保护与维护。

北川驴蹄草 (*Caltha dysosmoides* Tao Zhang et al) 属于毛茛科 (Ranunculaceae) 驴蹄草属的一个新种, 于 2014 年在四川片口省级自然保护区内首次发现, 同时在北川羌族自治县青片乡区域内也有少量分布, 一般生于海拔为 1 900 m ~ 2 500 m 的潮湿山谷或溪边, 以及相对比较阴湿的林下草坡处。北川驴蹄草作为新发现物种, 相关研究较少, 主要涉及到物种分类方面<sup>[1]</sup>、群落特征方面<sup>[2]</sup>。但有关北川驴蹄草的生殖生物学研究尚未见报道。

## 1 研究地点与方法

### 1.1 研究区域概况

本文所研究区域位于四川省片口省级自然保护区内, 地理坐标为: 北纬 32°02' ~ 32°12', 东经 104°10' ~ 104°26'。选取研究的北川驴蹄草主要分布于不同海拔的 5 个地点<sup>[2]</sup> (表 1), 具体位于北川县片口、小坝、开坪 3 个乡境内。地处四川盆地西缘, 青

表 1

不同海拔北川驴蹄草的分布状况

Tab. 1

Distribution of Beichuan *Caltha* at different altitudes

生境/样地	平沟	陡沟	亲家沟	正沟	石板棚沟
海拔 (m)	1 933	2 031	2 132	2 213	2 328
经度 (N)	104°11'19"	104°10'51"	104°13'6"	104°13'21"	104°13'36"
纬度 (E)	32°13'52"	32°15'43"	32°14'28"	32°13'12"	32°14'30"
土壤类型	山地黄壤	山地黄棕壤	山地黄棕壤	山地黄棕壤	山地黄棕壤
土壤湿度	干	润	湿	湿	潮
多度	3	5	10	8	4
群聚度	1	2	4	4	3

藏高原东南缘岷山中段, 龙门山西侧, 与平武泗耳自然保护区的锁江、大印交界, 东与本县都贯羌族乡、南与小坝羌族藏族乡, 西与青片羌族藏族乡接壤, 海拔 1 100 m ~ 3 320 m。保护区内气候温和, 四季分明, 雨量充沛, 年均气温 15.6℃, 为亚热带季风性湿润气候。特殊的地理位置与湿热的气候条件, 使自然保护区内的植被垂直地带性分布明显, 森林资源丰富, 动植物种类繁多<sup>[3-5]</sup>。

### 1.2 材料与方法

#### 1.2.1 花部构成特征调查

从 2016 年 4 月到 2016 年 5 月花期结束, 照 Dafni (1992) 所述标准对盛花期北川驴蹄草的开花动态进行观测, 每次取 20 m × 20 m 的样方, 单花花期, 每株 1 朵花, 观测时均注意记录花朵开放、花粉散出、柱头伸长、花蜜与气味开始和持续的时间等, 并记录花朵形状、大小、颜色和它们的时空动态, 尤其注意柱头与花药的位置, 观察并记录其花部特征<sup>[6]</sup>。随机选取 50 株驴蹄草植株进行标记, 用游标卡尺测量并记录开花时间及花器官各部分大小。

#### 1.2.2 TTC 法花粉活性测定

于每天 8:30 ~ 18:30 每隔 3h 分别采集不同发育时期的新鲜花备用。花粉活力采用 TTC 法测定<sup>[7]</sup> (将新鲜花粉置于载玻片上, 同时用火加热致死的花粉作对照)。具体操作如下: 将开花后不同时期的花粉撒在载玻片上, 滴加 1 ~ 2 滴 0.5% TTC

溶液 (2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑; 用 0.2 M、pH7.2 的磷酸缓冲液配制成 0.5% TTC 溶液并加入适量 10% 的蔗糖溶液), 迅速盖上盖玻片, 置入垫有湿润滤纸的培养皿中, 放在 25℃ 黑暗条件下培养 2h 左右。在显微镜下观察, 若花粉变红则表明有活力, 若红色很浅或无变化或变黑色则表明无活性。统计全部花粉中红色花粉所占比例 (每片载玻片上的花粉数 > 500 粒, 重复 5 朵花)。

#### 1.2.3 花粉萌发观察

采用液体培养基培养法, 培养基的组分为: 蔗糖 + 硼酸 + 硝酸钙, 其中外源钙浓度为 0.1%, 蔗糖浓度为 10%、20%、30%, 硼酸浓度为 10 mg · L<sup>-1</sup>、50 mg · L<sup>-1</sup>、100 mg · L<sup>-1</sup>、200 mg · L<sup>-1</sup>, 以两者不同浓度组合配置 12 种培养液, 分别置于干净培养皿中。野外采集花开而花药未开裂的花朵, 将少量花粉均匀撒于培养基上, 在室温条件下分别培养 0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h 后镜检。每种培养基制片 3 张, 每张装片随机选取 5 各视野观察, 统计花粉萌发率并计算平均值。参照赖焕林等的研究方法并做适当调整, 认为当花粉粒表面有不规则凸起时, 花粉即为萌发。计算公式为:  $A = (x/y) * 100\%$ 。式中 A = 花粉萌发率 (%); x = 视野中已萌发花粉数; y = 视野中花粉粒总数。

#### 1.2.4 柱头可授性的测定

用联苯胺 - 过氧化氢法测定柱头可授性<sup>[8]</sup>, 直

到无活力为止。去除花的各部分只剩下雌蕊(柱头);加入联苯胺-过氧化氢溶液(1%联苯胺:3%过氧化氢:水=4:11:22,体积比)于凹槽中,并立即观察;若柱头具有可授性,其周围发生反应,呈现蓝色并伴有大量气泡出现,此时认真观察并记录其活力情况;否则无气泡产生且不变蓝。

## 2 结果与分析

调查研究结果表明,在自然条件下,北川驴蹄草4月~5月开花,群体花期约60 d,全体盛花花期约25 d,集中在4月15日~5月10日,单株花期10 d~15 d,单花花期2 d。雄蕊短于雌蕊,花药紧贴花柱外侧,花药与柱头相距约3 mm,在整个花朵开放的过程中雌蕊和雄蕊的相对位置不变。

### 2.1 北川驴蹄草花部构成特征

北川驴蹄草为单歧聚伞花序,两性花,由3朵小花组成1个花序,隐藏于叶下开放(图1)。片口驴蹄草每朵小花花梗长25 cm~50 cm,小花多有5片萼片,深红色,分为两层,上层两片,下层3片(图2),少有6~8片萼片。萼片长15 cm~25 cm,宽10 cm~20 cm。雄蕊25~50枚,呈黄色,雄蕊长5 cm~10 cm,花药黄色,花药位于花柱外侧,柱头下方。雌蕊10~15枚,呈绿色,雌蕊长5 cm~10 cm,柱头位于花柱顶端,直径约5 mm,长约8 mm(表2)。



图1 北川驴蹄草的单歧聚伞花序

Fig.1 The monochasium of Beichuan *Caltha*

### 2.2 TTC 法花粉活力检测结果

选取当天开花后2 h、4 h、6 h和8 h的北川驴蹄草花粉进行TTC法花粉活性测定,结果表明:北川驴蹄草花粉活性在8 h期间呈上升趋势(图3),



图2 北川驴蹄草花部特征

Fig.2 The characteristics of Beichuan *Caltha*

表2 北川驴蹄草的花朵性状

Tab.2 Floral quantitative character of Beichuan *Caltha*

观测项目 Items	尺寸大小 Size
花朵直径 Flower diameter (mm)	25.45 ± 6.11
花梗长 Pedicel length (mm)	37.23 ± 10.23
萼片长 Sepal length (mm)	19.90 ± 3.85
萼片宽 Sepal breadth (mm)	18.57 ± 3.58
柱头直径 Stigma diameter (mm)	0.49 ± 0.20
柱头高 Stigma height (mm)	86 ± 0.92
花柱高 Style height (mm)	6.83 ± 1.45
雄蕊长 Stamens length (mm)	6.93 ± 1.28
雌蕊长 Gynoeceium length (mm)	7.69 ± 1.41

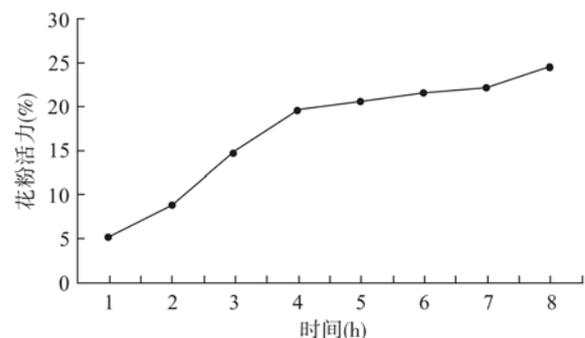


图3 当天花粉活力随时间的变化

Fig.3 Changes of pollen viability in the following times

前4 h上升趋势较快,后4 h增势趋缓。从图3可以看出花粉的活力在散粉后第8小时已经趋于最大值,部分花粉活力仍具有增势。

### 2.3 北川驴蹄草花粉萌发实验结果分析

采用液体培养基进行花粉萌发实验(表3)。结果表明,花粉管生长状况良好;所测得花粉萌发情况及萌发率和TTC法花粉活力测定结果较为一致,萌发率略高于TTC法花粉活力测定值,两者实验结果起到互相检测和修正的作用。

表3 北川驴蹄草8h内(白昼)的花粉萌发

Tab.3 Germination test of Beichuan *Caltha* pollen within 8 hours (daytime)

取样时间(h) Sampling time	视野平均花粉 总数(个) Average pollen number	花粉萌发数 (个) Pollen germination number	花粉萌发率 (%) Pollen germination rate
1	672	78	0.12
2	632	154	0.24
3	674	182	0.27
4	568	167	0.29
5	587	228	0.39
6	603	213	0.35
7	627	190	0.30
8	536	180	0.34

## 2.4 柱头可授性实验结果

白天随机选取北川驴蹄草花朵即将开放的柱头,以及已开放后柱头。采用联苯胺-过氧化氢法测定柱头可授性,实验结果表明(图4),北川驴蹄草的柱头在开而未开放3h内已具有可授性,柱头可授性增长缓慢,3h后花朵开放后柱头活性增势最大,7h~8h柱头的可授性明显趋于降低,但仍具有活性。

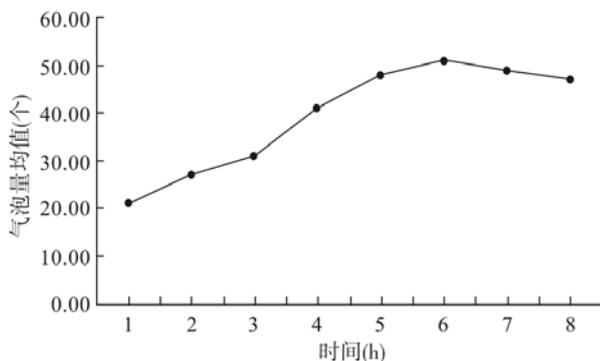


图4 8h内(白昼)北川驴蹄草柱头活力变化

Fig.5 Changes of stigma vigor of Beichuan *Caltha* in 8 hours (daytime)

## 3 结论与讨论

北川驴蹄草单花花期为2d,4月~5月开花,群体花期约60d,全体盛花花期约25d,集中在4月15日~5月10日,单株花期10d~15d,单花花期2d。雄蕊短于雌蕊,花药紧贴花柱外侧,花药与柱头相距约3mm,在整个花朵开放的过程中雌蕊和雄蕊的相对位置不变。北川驴蹄草开花后花粉在8h内活力一致呈上升趋势,并有继续上升的趋势,花粉活

力在早上明显低于下午。花粉萌发情况及萌发率和TTC法花粉活力测定结果较为一致。

研究结果表明北川驴蹄草在花开而未开放3h内已具有可授性,其可授性增长缓慢,3h后花朵开放以后柱头活性增势最大,7h~8h柱头的可授性明显趋于降低,但仍具有活性。植物有多种方式促进异交,其中雌雄异株和自交不亲和是专性远交机制,而其他机制由于具有一定程度的雌性和雄性重叠,因而存在或多或少的自交比例。尽管雌雄同株不能完全避免自交,但趋向远交,或促进远交<sup>[9~11]</sup>。本实验中根据柱头周围出现气泡的快慢、大小和数量来比较划分柱头可授性的强弱等级,存在一定的人为因素误差<sup>[12]</sup>。本文仅对北川驴蹄草的柱头活性大小进行简单研究,未开展套袋实验,下一步将对其繁育系统开展细致研究。

## 参考文献:

- [1] BING LIU, YUN-QING HAO, YONG YANG. A new species of the Ranunculaceae from southwestern China based on morphological and molecular data[J]. *Phytotaxa* 283 (1):043~053.
- [2] 谢欢欢,何周窃,胡进耀,等. 北川片口驴蹄草(*Caltha palustris*)群落特征研究[J]. *四川林业科技*,2016,06:97~100.
- [3] 胡进耀. 四川片口省级自然保护区综合科学考察报告. 北京:中国林业出版社,2015. 12.
- [4] 胡进耀. 四川小寨子沟国家级自然保护区综合科学考察报告. 北京:中国林业出版社,2015. 04.
- [5] 刘美,张涛,谭永燕,等. 片口自然保护区不同海拔团竹克隆生长研究[J]. *江苏农业科学*,2015,(7):197~199,200.
- [6] 肖宜安,何平,李晓红. 濒危植物长柄双花木的花部综合特征与繁育系统[J]. *植物生态学报*,2004,03:333~340.
- [7] DAFNI A. *Pollination Ecology: A Practical Approach* [M]. New York:Oxford University Press,199:21~35.
- [8] 叶要妹,张俊卫,齐迎春,等. 百日草柱头可授性和花粉生活力的研究[J]. *中国农业科学*,2007,40(10):2376~2381.
- [9] DULMEN A V. Pollination and phenology of flowers in the canopy of two contrasting rain forest types in Amazonia, Colombia [J]. *Plant Ecol.*,2001,153:73~85.
- [10] BAWA K S, PERRV D R, BEACH J H. Reproductive biology of tropic lowland rain forest trees. I. Pollination systems [J]. *Amer. J. Bot.*,1985,72:331~345.
- [11] BAWA K S, BULLOCK S H, PERRY D R, COVIIE R E, GRAYUM M H. Reproductive biology of tropic lowland rain forest trees. II. Pollination systems [J]. *Amer. J. Bot.*,1985,72:346~356.
- [12] 王湘南,陈永忠,王瑞,等. 油茶花粉活力及柱头可授性研究 [J]. *中南林业科技大学学报*,2012,03:17~22.