

· 基础研究 ·

辽宁老鹳草属植物花粉形态特征比较[△]刘维雅¹, 尹海波^{2*}, 谷静逸², 李旭², 张董詠², 邓聪², 王娜², 任雪²

1. 辽宁省卫生健康委员会, 辽宁 沈阳 110000; 2. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600

[摘要] 目的: 通过对辽宁产老鹳草属植物花粉形态进行观察, 达到同属植物区别鉴定的目的。方法: 利用扫描电镜(SEM)对辽宁老鹳草属植物花粉的大小、形态、表面纹饰、萌发沟等特征进行观察、比较和分类。结果: 7种老鹳草花粉均为近球形, 外壁均为棒状-网纹复合纹饰, 而在花粉粒大小、萌发沟大小、棒状形态及大小、网眼均匀程度及大小上均有差异。结论: 实验结果对老鹳草属植物种的划分和鉴定具有一定的指导意义, 同时为揭示老鹳草属植物种质资源多样性奠定了基础。

[关键词] 老鹳草属; 扫描电镜; 花粉形态; 鉴别; 分类

[中图分类号] R282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)10-1372-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190306002

Comparative study on pollen morphology of *Geranium* in Liaoning ProvinceLIU Wei-ya¹, YIN Hai-bo^{2*}, GU Jing-yi², LI Xu², ZHANG Jin-he², DENG Cong², WANG Na², REN Xue²

1. Health and Family Planning Commission of Liaoning Province, Shengyang 110000, China;

2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

[Abstract] **Objective:** to observe the pollen morphology of *Geranium* species in Liaoning Province, and to achieve the purpose of differential identification of the same genus. **Methods:** the pollen size, morphology, surface ornamentation and germination ditch of *Geranium* species in Liaoning province were observed, compared and classified by scanning electron microscope(SEM). **Results:** The pollen of seven kinds of *Geranium* species were nearly spherical, and the outer wall was rod-like composite pattern, and there were differences in the size of the pollen, the size of the germination ditch, the rod shape and the size, the degree and the size of the mesh. **Conclusion:** the experimental results have certain guiding significance for the division and identification of *Geranium* species, and lay a foundation for revealing the diversity of *Geranium* resources.

[Keywords] *Geranium*; SEM; pollen morphology; identification; classification

孢粉与其他生殖器官一样, 较少受环境的影响, 其形态较为稳定, 且 Erdtman^[1]认为, 利用花粉粒形态特征可以提高一些植物分类精确度, 对于种内分类具有重要意义。近年来, 不少学者借助 SEM 观察植物的花粉形态, 对同属植物不同种或品种进行分类鉴定, 为探究种间亲缘关系提供参考^[2-3]。老鹳草为我国常用中药, 全草入药, 具有祛风除湿的功效; 目前关于老鹳草属植物花粉形态的报道中, 光景森、Yanazaki 等^[4]分别对牻牛儿苗、老鹳草属 20 种植物

进行花粉粒形态的描述; 谭仲明等^[5]曾对四川省老鹳草属植物的花粉形态进行观察研究, 具有一定的系统学意义, 但并未生成较为系统的分类依据; 刘娟等^[6]曾对黑龙江省 4 种老鹳草属植物的花粉形态进行研究, 但并未做分类研究; 尹海波^[7]曾对东北地区 9 种老鹳草属植物的花粉进行光镜观察, 并编写分类检索表。我国有老鹳草属植物 55 种^[8], 其中分布于辽宁省的有 7 种^[9], 目前尚无文献对辽宁老鹳草属植物的分类进行系统梳理, 阐明老鹳草属植

[△] **[基金项目]** 中央本级重大增减支项目(2060302); 中医药行业科研专项(201407002); 辽宁省自然科学基金项目(20180550894); 辽宁省盖州市中药资源普查项目(2017001); 辽宁省凌源市、龙城区、双塔区中药资源普查(2018001)

* **[通信作者]** 尹海波, 教授, 博士生导师, 研究方向: 种质资源鉴定及中药品质评价; Tel: (024) 23388416, E-mail: 1843598824@qq.com

物是否存在分类争议,故本文利用扫描电子显微镜对辽宁省老鹳草属植物花粉形态特征进行观察,通过花粉形态的差异对 7 种老鹳草进行聚类分析,并编写分类检索表,为老鹳草属植物种类鉴定和分类提供更多依据,以期为该属植物的孢粉学研究提供新资料。

1 材料与方法

1.1 材料

花粉材料均于 2015 年 8—9 月采自辽宁省东部山区,并经大连自然博物馆张淑梅教授和辽宁中医药大学药用植物教研室尹海波教授鉴定。样品来源信息见表 1。

1.2 方法

取成熟饱满的花蕾,置于硫酸纸袋中,硅胶干燥,用镊子分别将干燥花粉均匀铺置于 1 cm × 1 cm 的导电双面胶带上,另一面黏在扫描电镜样品台上,用离子溅射镀膜仪在样品表面镀上一层 15 nm 厚的金膜。将处理好的样品放入样品盒中,用场发射扫描电子显微镜(SU8010 日立)进行扫描、拍照。

1.3 统计分析

每种随机选取成熟饱满的花粉粒 20 粒,花粉粒大小用极轴长(E) × 赤道轴长(P)表示,极轴和赤道轴比(P/E)表示花粉粒形状,P/E 在 0.88 ~ 1.14 为近球形^[10]。在扫描电镜下对表面纹饰棒状体、网眼、沟宽和沟深进行观察并测量,采用 SPSS 软件分别计算均值和标准差,然后对 7 种老鹳草之间的大致亲缘关系进行聚类、编写检索表。

2 结果与分析

2.1 花粉大小和形态特征

在扫描电镜下,7 种老鹳草属植物的花粉粒均为近球形;不同种老鹳草属植物的花粉粒大小差异有统计学意义($P < 0.05$),其中毛蕊老鹳草的花粉粒最大,其次分别为突节老鹳草和朝鲜老鹳草、长白老鹳草、块根老鹳草、老鹳草,鼠掌老鹳草的花粉粒最小,该结果与原植物花直径的大小一致,即花粉粒大的花朵也大。另外,花粉粒具 3 孔沟,沟短,3 条孔沟作 120°等分分布,部分孔沟有清晰的内含物,可作为辽宁省老鹳草属植物花粉的主要鉴别特征。详见表 2 和图 1。

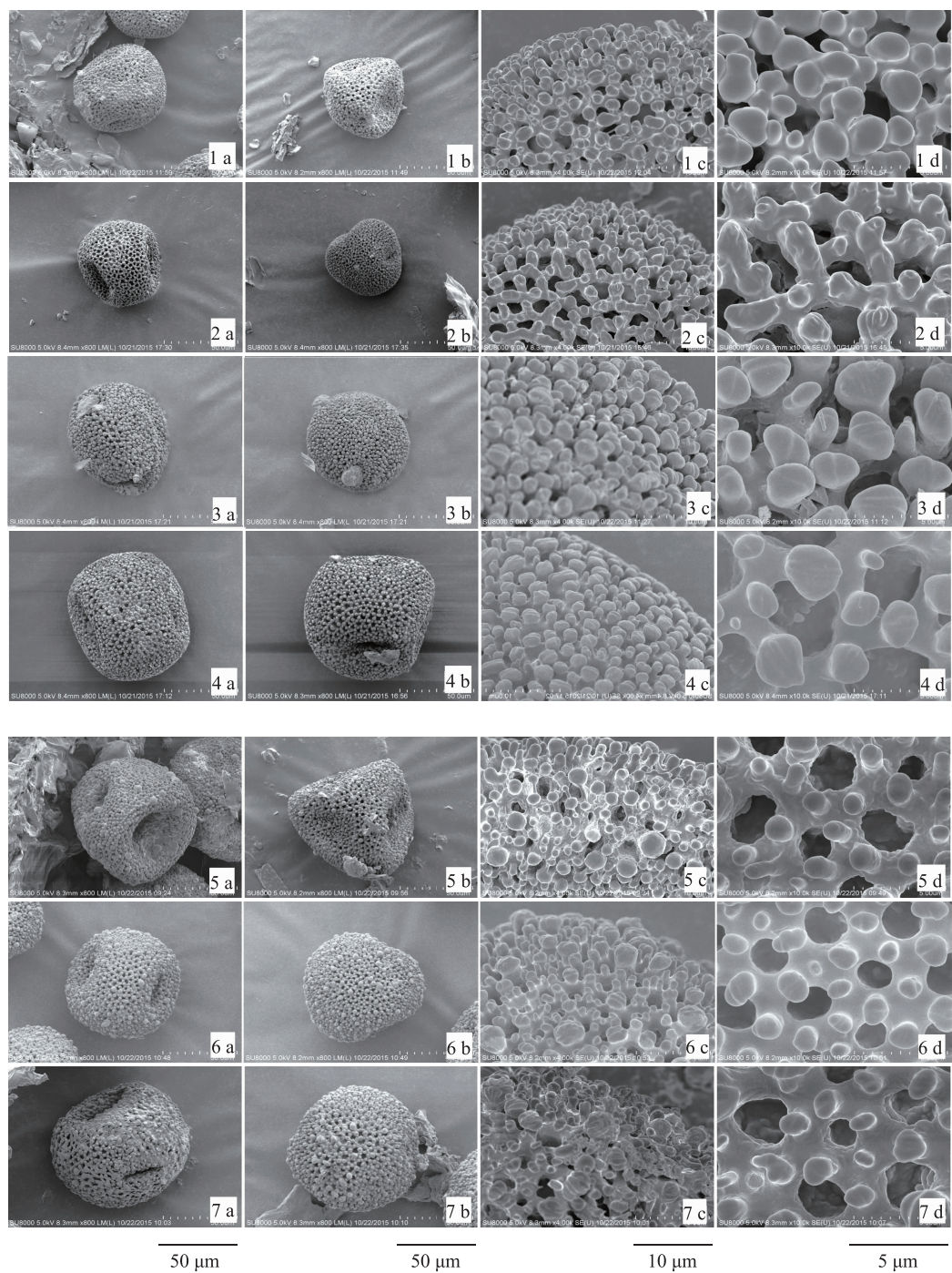
表 1 老鹳草属植物样品基本信息

名称	经度	纬度	采集地点	采集时间
老鹳草 <i>Geranium wilfordii</i> Maxim.	E125°26'52.43"	N41°13'20.21"	本溪市桓仁县	2015 年 8 月
鼠掌老鹳草 <i>G. sibiricum</i> L.	E124°18'12.48"	N41°13'18.32"	本溪市本溪县	2015 年 9 月
块根老鹳草 <i>G. dahuricum</i> DC.	E125°01'21.96"	N41°45'51.48"	抚顺市新宾县	2015 年 8 月
突节老鹳草 <i>G. krameri</i> Franch. et Sav. Enum.	E124°49'08.21"	N42°07'10.87"	抚顺市清源县	2015 年 8 月
朝鲜老鹳草 <i>G. koreanum</i> Kom. in Act.	E125°29'30.36"	N41°08'59.55"	本溪市桓仁县	2015 年 8 月
长白老鹳草 <i>G. paishanense</i> Y. L. Chang.	E124°01'30.72"	N41°28'57.04"	本溪市本溪县	2015 年 9 月
毛蕊老鹳草 <i>G. eriostemon</i> Fish. ex DC.	E124°13'42.88"	N41°06'35.15"	本溪市桓仁县	2015 年 8 月

表 2 7 种老鹳草属植物花粉形态特征的比较($n = 3$)

种名	花粉形态特征指标							
	形状	赤道轴长(E)	极轴长(P)	P/E	沟宽	沟深	棒状体大小	网眼大小
<i>G. wilfordii</i> Maxim.	近球形	63.01 ± 7.20a	56.87 ± 3.46a	0.90	29.05 ± 7.75a	8.64 ± 2.18a	1.86 ± 0.57a	1.74 ± 0.33a
<i>G. sibiricum</i> L.	近球形	61.10 ± 4.50d	55.68 ± 5.20a	0.91	27.76 ± 7.26a	8.11 ± 2.35a	1.83 ± 0.83a	1.56 ± 0.35a
<i>G. eranim dahuricum</i> DC.	近球形	71.86 ± 7.67b	65.91 ± 7.06b	0.92	29.17 ± 5.44b	7.05 ± 1.89b	1.84 ± 0.53a	2.33 ± 0.42b
<i>G. krameri</i> Franch. et Sav. Enum.	近球形	89.92 ± 6.70c	83.45 ± 5.86c	0.93	32.31 ± 6.49b	7.16 ± 1.90c	1.78 ± 0.49a	3.72 ± 0.62c
<i>G. koreanum</i> Kom. in Act.	近球形	90.98 ± 3.48c	82.61 ± 6.75c	0.91	35.42 ± 10.36a	8.18 ± 2.35a	1.91 ± 0.79a	1.73 ± 0.57a
<i>G. paishanense</i> Y. L. Chang.	近球形	80.34 ± 3.68e	73.79 ± 3.52e	0.92	21.40 ± 7.11b	6.82 ± 1.90b	1.56 ± 0.50a	2.11 ± 0.61b
<i>G. eriostemon</i> Fish. ex DC.	近球形	96.25 ± 3.45f	86.97 ± 4.43d	0.90	33.22 ± 7.93b	6.29 ± 1.72d	1.64 ± 0.50a	2.80 ± 0.93d

注:同一列不同字母表示差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。



注: a. 赤道面观; b. 极面观; c. 外壁一纹饰; d. 外壁二纹饰; 1. 老鹳草; 2. 鼠掌老鹳草; 3. 块根老鹳草; 4. 突节老鹳草; 5. 朝鲜老鹳草; 6. 长白老鹳草; 7. 毛蕊老鹳草。

图 1 扫描电镜下老鹳草属 7 个种的花粉形态($\bar{x} \pm s, n = 20$)

2.2 花粉外壁纹饰

孢子花粉的外壁纹饰是细分孢子属种的重要特征之一^[10]。本实验的 7 种老鹳草属植物花粉均为复合纹饰,外壁一为短棒状纹饰,外壁二为网状纹饰。但棒状形态及大小、网纹均匀程度和大小有较明显差异,见表 2。其中,网眼大小、萌发沟宽和沟深

经方差分析后差异有统计学意义,而棒状体的差异主要体现在其形态和大小均匀程度上。

2.3 聚类分析

用欧式距离法对赤道轴长、极轴长、棒状体大小、网眼大小、赤道面观中的沟宽和沟深 6 个指标进行聚类分析,见图 2。若以链接距离 17 来划分,

7种老鹳草大致可分为两类,突节老鹳草、朝鲜老鹳草、毛蕊老鹳草为一类,老鹳草、鼠掌老鹳草、块根老鹳草和长白老鹳草为一类。其中,老鹳草和鼠掌老鹳草亲缘关系最为接近,突节老鹳草和毛蕊老鹳草的亲缘关系较为接近,该归类结果与ISSR分子标记的亲缘关系聚类结果稍有出入^[11],但可将大花组和小花组完全分开。

2.4 花粉特征检索表

花粉作为植物的保守结构,其形态特征具有可遗传性,同时具有科属的共同特征和种的特异性,可将花粉形态特征作为植物的分类依据^[10]。

3 结论与讨论

3.1 对辽宁省老鹳草属植物的考证

据《中国植物志》记载,北方老鹳草 *G. erianthum*

DC. 产于吉林省东部;《东北草本植物志》收录老鹳草属植物共9种,其中记载辽宁省内有6种,另记载北方老鹳草在吉林省多个县内均有分布;《辽宁植物志》共收录老鹳草属植物7种,亦未将毛蕊老鹳草 *G. eriostemon* Fish. ex DC. 列入其中,而将 *G. erianthum* DC. 收录。本实验取材主要基于以下两点:一是《中国植物志》第43卷成书于1997年,《东北草本植物志》第6卷成书于1977年,《辽宁植物志》成书于1988年。不难推测,《东北草本植物志》对辽宁省仅有6种的记载实为纰漏,成书最晚的《中国植物志》明确收载于《辽宁植物志》的 *G. erianthum* DC. 一种产于吉林省,该说法与《东北草本植物志》的信息一致,而 *G. erianthum* DC. 和 *G. eriostemon* Fish. ex DC. 在亲缘关系上极为相近^[11],因此,初步判断《辽宁植物志》对 *G. erianthum* DC.

1. 花粉粒较大,大于(90×90)μm²

2. 外壁一纹饰的棒状大小无明显差异 *G. krameri* Franch. et Sav. Enum.

2. 外壁一纹饰的棒状大小差异明显

3. 棒状末端表面具一条带状凸起 *G. paishanense* Y. L. Chang.

3. 棒状末端表面具多条带状凸起 *G. eriostemon* Fish. ex DC.

1. 花粉粒较小, <(90×90)μm²

4. 外壁一纹饰的棒状大小差异明显 *G. koreanum* Kom. in Act.

4. 外壁一纹饰的棒状大小无明显差异

5. 棒状体末端表面具瘤状凸起 *G. sibiricum* L.

5. 棒状体末端表面具带状凸起

6. 外壁二网状纹饰的网眼直径>2 μm *G. eranim dahuricum* DC.

6. 外壁二网状纹饰的网眼直径<2 μm *G. wilfordii* Maxim.

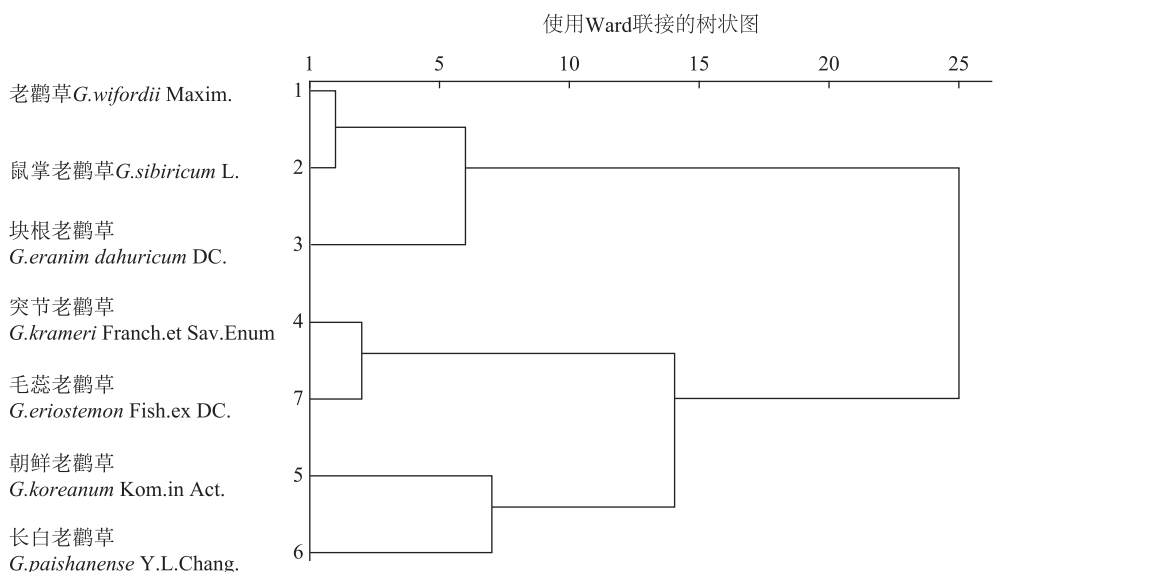


图2 7种老鹳草属植物花粉特征聚类分析

很可能为误定。二是在实地考察中,2014、2015年6—9月在辽宁省调查了近200个天然山区,其中包括《辽宁植物志》中对*G. erianthum* DC. 有收录的桓仁、宽甸等山区,并未发现*G. erianthum* DC.,而*G. eriostemon* Fish. ex DC. 在辽宁山区尤其本溪县内普遍分布较多;后又考察了中国科学院沈阳生态所(中国科学院林业土壤研究所前身)的凭证标本,该标本现无根部、无花果部位,唯有3大3小叶片存留,虽叶裂均至3/4处,但就目前不完整的信息并不能排除是*G. eriostemon* Fish. ex DC. 的可能性。此外,曾在该所*G. erianthum* DC. 标本的标注地区桓仁老秃顶多次进行较大规模的考察,依然未能发现该种。综合以上两点考证,笔者可初步断定辽宁省的老鹳草属植物共7种,分别为*G. wilfordii* Maxim.、*G. sibiricum* L.、*G. erianthum* DC.、*G. krameri* Franch. et Sav. Enum.、*G. koreanum* Kom. in Act.、*G. paishanense* Y. L. Chang. 和*G. eriostemon* Fish. ex DC.,而更正了《辽宁植物志》中的*G. erianthum* DC.,结论为老鹳草属植物的开发利用和扩大药源提供了参考。

3.2 花粉形态特征在属下阶元划分的意义

据前期研究发现,7种老鹳草外观形态差异极小,仅从叶片的分裂个数及花的大小来进行区别。而在扫描电镜下,7个老鹳草属植物的花粉均为近球形,三萌发孔,沟短而粗,表面均为棒状-网纹复合纹饰,表明老鹳草属植物这一自然类群具有较稳定的共同特征。该7种老鹳草属植物的花粉表面虽同为棒状-网状复合纹饰,但在花粉大小、棒状形态及大小、网纹饰均等程度和大小、萌发孔沟宽、沟深等方面均有不同程度的差异。而这些差异表明以上特征在植物分类和开发药用资源上具有重要的分类学价值,但是否可以作为该属植物分类、鉴定的重要依据还需对其他老鹳草属植物的花粉作进一步相关研究后方可得知,目前仅能对辽宁省内的老鹳草属植物进行初步分类。

3.3 关于聚类分析与传统分类结果不完全相符问题

首先,在依据外部形态对属下系划分的传统分类下,突节老鹳草和块根老鹳草的亲缘关系最为接近的观点已由ISSR分子标记技术研究证实^[12],而图2的聚类结果表明,突节老鹳草和毛蕊老鹳草的亲缘关系最为接近,进而表明花粉粒特征的系统聚类并不能够反映辽宁省内老鹳草属不同种之间的亲缘关系。但聚类结果却准确地将原植物形态上的大花组和小花组划分开来,而块根老鹳草和突节老鹳

草虽然外观形态极为相似,亲缘关系也最为接近,但两者最显著的差异在于花的大小,突节老鹳草花直径在2~3 cm,块根老鹳草花直径1.5 cm左右。因此,根据花粉形态特征将块根老鹳草与花直径<2 cm的老鹳草和鼠掌老鹳草归为一类,实由原植物花本身特征所决定,虽与全株的亲缘关系略有差异,却也在情理之中;其次,本文的数据源于每种20粒花粉的大小,20个纹饰指标观测值,最终比较均值,观察数量的有限难免也会对聚类结果产生一定影响;再者,从SEM镜下不难看出,一些花粉粒或多或少有变形现象产生,加之测量的人为误差,个别数据的不准确亦可能影响聚类结果。但靠孢粉学证据对辽宁省的老鹳草种进行分类已可初步实现,而对亲缘关系的考察无法单靠孢粉学证据完成,却在老鹳草属植物种的分类上具有一定的实际意义,该结果可为老鹳草属植物的资源开发奠定一定的基础。

参考文献

- [1] ERDTMAN G, PALYNOLOGY. Advances in botanical research[M]. London: Academic Press, 1963: 149-208.
- [2] 张芳,张永清,周凤琴,等. 忍冬5个农家品种花粉形态比较观察[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1266-1268.
- [3] 谢作成,郭巧生,邵清松,等. 杭菊5个新栽培类型及传统型药用菊花花粉形态比较研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(21): 2556-2559.
- [4] 蔡少青,李军. 常用中药材品种整理和质量研究:第5册[M]. 北京:北京医科大学 中国协和医科大学联合出版社, 2001: 331.
- [5] 谭仲明,赵炳祥,程子白,等. 四川老鹳草属植物的花粉形态及其系统学意义[J]. 四川大学学报, 1996, 33(2): 206-214.
- [6] 刘娟,陆叶,沈丽. 黑龙江省4种老鹳草属植物的花粉形态研究[J]. 中药材, 2001, 25(1): 14-15.
- [7] 尹海波. 东北产老鹳草类药材的生药学研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2007.
- [8] 中国植物志编委会. 中国植物志: 43卷. 第1册[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 23-26.
- [9] 李书心. 辽宁植物志: 上册[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1988: 1000-1003.
- [10] 王开发,王宪曾. 孢粉学概论[M]. 北京: 北京大学出版社, 1983: 21-29.
- [11] 辽宁省林业土壤研究所. 东北草本植物志: 第6卷[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 11.
- [12] 尹海波,谷静逸. 辽宁省老鹳草类植物亲缘关系与遗传多样性的ISSR分析[C]//世界中医药学会联合会中药鉴定专业委员会, 2015: 202-206.

(收稿日期: 2019-03-06 编辑: 王笑辉)