

doi:10.11937/bfyy.20170601

广金钱草花粉活力测定及贮藏方法

唐晓敏, 程轩轩, 张春荣, 潘海运, 杨全

(广东药科大学 中药学院, 广东 广州 510006)

摘要:以广金钱草花粉为试验材料,用染色法和离体培养法研究广金钱草花粉活力最佳测定方法,并探讨花粉贮藏的适应条件。结果表明:醋酸洋红染色法能快速检测广金钱草花粉活力,但活力较离体培养法低19.07%。广金钱草花粉在15%蔗糖+0.01% H_3BO_3 +0.09% $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ +0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的液体培养基上培养2 h萌发率最高(96.16%),花粉管长度达到541.72 μm 。花粉贮藏72~168 h,4 $^{\circ}C$ 干燥处理明显高于其它贮藏条件下的花粉活力。试验表明,离体培养法最适合广金钱草花粉活力测定,4 $^{\circ}C$ 干燥贮藏条件下有利于花粉活力保持。

关键词:广金钱草;花粉活力;贮藏方法

中图分类号:Q 949.747.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)21-0146-05

广金钱草(*Desmodium styracifolium* (Osbeck.) Merr.)属豆科山蚂蝗属一年生常用中药。主产于广东、广西、云南等地,具有抗泌尿系统结石、改善心血管系统、抗炎和利胆的作用^[1],在临床上用于治疗尿路结石、胆结石等症^[2],随着广金钱草的广泛应用,年消耗量逐年增大,野生资源不能满足市场需求^[3]。近年来,课题组开展了广金钱草种质资源调查^[4]、种子萌发特性^[5]、施肥技术^[6-7]等方面的研究,在研究生殖生物学特性时发现,广金钱草以自交为主,异交亲和^[8],而自交会导生活力降低。广金钱草依靠种子繁殖,因此,异株异花人工授粉是提高广金钱草产量和药材质量的有效途径。而花粉是遗传信息的载体,其质量直接影响授粉效果。花粉保持活力的时间长短和柱头可授粉期的长短组合在一起,深刻影响着

植物传粉的成功率、自花传粉率等^[9]。因此,研究采用染色法和离体培养法分别测定了广金钱草花粉的活力,筛选最佳萌发条件。同时,研究了广金钱草的最佳贮藏方法,以期为广金钱草花粉贮藏、人工授粉等工作提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试广金钱草种植于广东药科大学中药学院药用植物园内(东经113 $^{\circ}$ 41'60",北纬23 $^{\circ}$ 05'50"),经杨全教授鉴别为*Desmodium styracifolium* (Osbeck.) Merr.。盛花期采集含苞待放的小花,带回室内,置于硫酸纸上,待花药散粉后将花粉收集在10 mL离心管中备用。

1.2 试验方法

1.2.1 不同染色方法检测花粉活力

I₂-KI 染色法^[10]:取适量花粉置于载玻片上,滴加2滴I₂-KI溶液,搅拌均匀,盖上盖玻片迅速观察。染成蓝紫色的花粉活力强,黄褐色的为发育不良的花粉。

TTC 染色法^[11]:取适量花粉置于载玻片上,滴加2滴0.5%的TTC溶液,搅拌均匀,在保湿

第一作者简介:唐晓敏(1980-),女,博士,讲师,研究方向为中药资源与开发。E-mail:txm1209@163.com.

责任作者:杨全(1972-),男,博士,教授,研究方向为中药材规范化生产与道地药材道地性机理。E-mail:yangquan7208@vip.163.com.

基金项目:国家新兴产业重大工程包中药标准化资助项目(ZYY-2017-099)。

收稿日期:2017-04-17

条件下于 37 ℃ 的恒温箱中培养 30 min 后取出盖上盖玻片镜检。有活力的花粉被染成红色,无活力的花粉不着色。

醋酸洋红染色法^[12]:取适量花粉置于载玻片上,滴加 1~2 滴醋酸洋红溶液,用镊子搅拌均匀,盖上盖玻片镜检。呈深红色的花粉粒是有生活力的,浅红色部分失去活力,无活力的花粉不着色。

MTT 染色法^[13]:取适量花粉置于载玻片上,滴加 2 滴 MTT 溶液,盖上盖玻片,室温条件下放置 15 min 镜检。染成粉红色或有不规则黑线的花粉具有活力。

1.2.2 培养基筛选

花药离体培养参考杜玉虎等^[14]的方法设计 16 种液体培养基(表 1)。在 1.5 mL 离心管中加入适量液体培养基,播种花粉后置于 25 ℃ 条件下,黑暗培养 2 h。取适量培养后的花粉滴于载玻片上,加盖盖玻片,显微镜下观察。以花粉管生长长度超过花粉粒直径作为已萌发依据,每处理统计 3 个视野,每视野花粉粒不少于 30 粒,测量花粉管长度 50 个,重复 3 次。花粉萌发率(%)=已萌发花粉数/花粉粒总数×100。

表 1 广金钱草花粉离体萌发液体培养基及其组分

Table 1 Components of liquid culture medium for *Desmodium styracifolium* (Osbeck.) Merr. pollen germination

序号	培养基组分 Components of culture medium			
Number	蔗糖 Sucrose	HBO ₃	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	MgSO ₄ · 7H ₂ O
1	5	0.01	0.01	0
2	5	0.05	0.03	0.01
3	5	0.10	0.06	0.02
4	5	0.20	0.09	0.03
5	10	0.01	0.06	0.03
6	10	0.05	0.09	0.02
7	10	0.10	0.01	0.01
8	10	0.20	0.03	0
9	15	0.01	0.09	0.01
10	15	0.05	0.06	0
11	15	0.10	0.03	0.03
12	15	0.20	0.01	0.02
13	20	0.01	0.03	0.02
14	20	0.05	0.01	0.03
15	20	0.10	0.09	0
16	20	0.20	0.06	0.01

1.2.3 培养时间筛选

将广金钱草的新鲜花粉置于 1.2.2 筛选出的最佳培养基上培养 2、4、6 h 后,统计花粉萌发率。

1.2.4 花粉的贮藏

干燥的花粉为置于硅胶干燥器中干燥 4 h 的花粉,湿润花粉为新鲜花粉。将干燥与湿润的花粉分别置于密闭的离心管中,置于室温、4 ℃ 和 -20 ℃ 条件下进行贮藏,每隔 24、72、120、168 h 取出一些花粉,用最佳培养条件进行培养。

1.3 数据分析

试验数据采用 Excel 2007 及 SPSS 16.0 分析软件进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同染色剂对广金钱草花粉活力的影响

由表 2 可以看出,醋酸洋红测定广金钱草花粉活力为 77.82%,I₂-KI、TTC、MTT 法均未检测到有活力的花粉,3 种染色方法均不适合广金钱草花粉活力测定,故醋酸洋红可以用于广金钱草花粉活力快速检测。

表 2 染色剂对广金钱草花粉活力的影响

Table 2 Pollen viability of *Desmodium styracifolium* (Osbeck.) Merr. under different stains

染色剂	颜色	花粉活力
Stains	Colour	Pollen viability/%
I ₂ -KI	淡灰色→黑色	0Bb
TTC	淡灰色,无颜色变化	0Bb
醋酸洋红	深红色、浅红色	77.82±2.31Aa
MTT	淡灰色→灰色	0Bb

注:不同字母表示 $P<0.01$ 或 $P<0.05$ 水平差异。下同。

Note: Different lowercase or capital letters in the same simulated acid rain types mean significant difference at $P<0.05$ or $P<0.01$ level. The same below.

2.2 不同培养条件对广金钱草花粉活力的影响

2.2.1 培养基筛选

由图 1 可知,广金钱草花粉在 8、9、10、11、12 号培养基上能很好的萌发,萌发率分别达到 91.07%、96.16%、92.91%、89.93% 和 93.22%,均极显著高于其它培养基($P<0.01$)。9 号培养基花粉管长度为 541.72 μm ,极显著高于其它培养基($P<0.01$)。因此,9 号为广金钱草花粉萌发的最佳培养基,其组分为 15% 蔗糖 + 0.01% H₃BO₃ + 0.09% Ca(NO₃)₂ · 4H₂O + 0.01% MgSO₄ · 7H₂O。

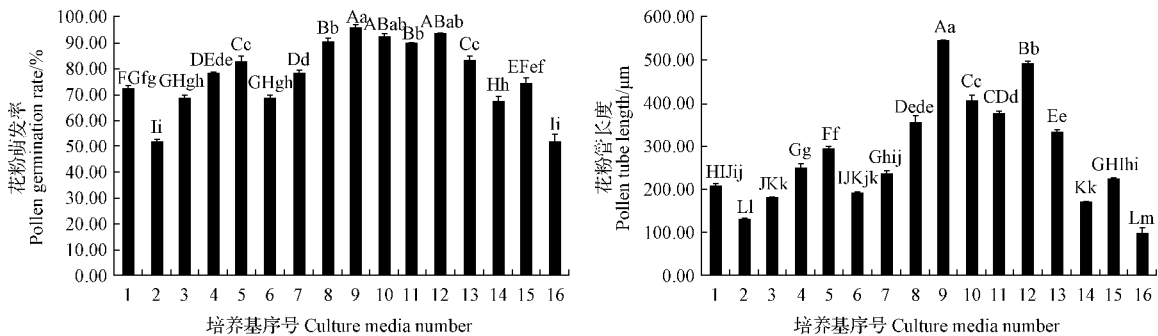


图1 不同培养基广金钱草花粉萌发率和花粉管长度

Fig. 1 Pollen germination rates and pollen tube lengths of *Desmodium styracifolium* (Osbeck.) Merr. on different culture mediums

2.2.2 培养时间筛选

从表3可以看出,培养2、4、6 h对广金钱草花粉萌发率无显著性影响。综合考虑成本和时间等因素,选择2 h作为广金钱草花粉培养基离体培养的最佳时间。

表3 不同培养时间广金钱草花粉萌发率

Table 3 Pollen germination rates of *Desmodium styracifolium* (Osbeck.) Merr. under different culture time

萌发率 Germination rate/%	培养时间 Culture time/h		
	2	4	6
	92.25±1.80	95.25±1.65	92.75±1.80

2.3 不同贮藏条件对花粉活力的影响

从表4可以看出,各处理的广金钱草花粉活力均随贮藏时间的延长而显著降低。随贮藏时间的延长,相同贮藏条件下干燥花粉活力显著高于湿润贮藏的花粉活力。贮藏24 h,以室温贮藏条件下的花粉活力最高,均在80%以上。贮藏168 h,4℃干燥贮藏条件下的花粉活力显著高于其它贮藏条件(P<0.05),较4℃湿润贮藏、室温干燥贮藏、室温湿润贮藏、-20℃干燥贮藏、-20℃湿润贮藏增加了41.10%、40.51%、74.79%、19.42%、196.72%。因此,广金钱草花粉在24 h内室温湿润贮藏即可,在72~168 h,4℃干燥贮藏活力最佳。

表4 不同贮藏条件下广金钱草花粉萌发率

Table 4 Pollen germination rate of *Desmodium styracifolium* (Osbeck.) Merr. under different storage conditions

贮藏时间 Storage time/h	-20℃贮藏 Storage at -20℃		4℃贮藏 Storage at 4℃		室温贮藏 Storage at room temperature	
	干燥 Dry		干燥 Dry		干燥 Dry	
	湿润 Wet		湿润 Wet		湿润 Wet	
0	94.57±0.88A	93.75±1.96Aa	94.57±0.88Aa	93.75±1.96Aa	94.57±0.88Aa	93.75±1.96A
24	67.91±1.77B	37.65±1.18Bb	78.99±4.79ABb	53.77±4.72Bb	84.40±2.09ABab	89.91±3.13A
72	50.35±0.99C	35.18±1.18Bbc	74.46±4.95Bbc	49.06±0.94BCbc	71.76±2.92Bbc	63.13±0.33B
120	40.97±2.03CD	30.92±1.62Bc	64.18±5.65BCcd	44.10±1.66BCcd	68.79±6.01Bc	58.91±5.33B
168	44.70±3.26D	17.99±1.79Cd	53.38±4.49Cd	37.83±0.32Cd	37.99±3.05Cd	30.54±1.73C

3 讨论

3.1 花粉活力测定方法

用于检测花粉活力的方法很多,但不同植物适宜的花粉活力测定方法不同,应选择不同方法^[15-17]。该试验在2013、2014年连续2年用

I₂-KI、TTC、醋酸洋红、MTT对广金钱草花粉进行染色,发现经过I₂-KI染色的花粉由浅灰色变成黑色,TTC不能将花粉染色;MTT将花粉从淡灰色染成灰色;醋酸洋红将花粉染成深红色和浅红色,花粉活力为77.82%。因此,4种染色法中醋酸洋红染色法适合广金钱草花粉活力的测定,

但测定过程中,生活力弱的花粉也被染色,镜检时注意区别颜色深浅,此法对于快速检测花粉活力是不错的方法。花粉离体培养通常在培养基上进行,常用的培养基基本成分是糖和硼,蔗糖的作用是提供合适的渗透压和花粉管形成所需能量,硼酸中的硼元素为微量元素,能促进花粉管的萌发^[18]。该试验研究表明,广金钱草花粉离体培养的最佳液体培养基为 15%蔗糖+0.01% H_3BO_3 +0.09% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ +0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。在此培养基上,25℃培养2h后,花粉萌发率达92.28%,与染色法相比,较醋酸洋红染色法花粉活力增加了18.58%,说明培养基离体培养法更适合广金钱草花粉活力的测定。

3.2 贮藏方法对花粉活力的影响

花粉活力的长短,一方面由遗传因素决定,另一方面受环境因素的影响,影响花粉寿命的关键因素是花粉湿度和贮藏温度,低温、低湿处理有助于花粉维持较长时间的生活力,在超低温度(-20~-18℃)下,花粉的生活力可以长期保存,对于大多数物种的花粉,若先经干燥再降低温度,则更有利于生活力的保持^[19]。银杏花粉活力在低温干燥条件下可维持1年^[20]。该研究表明,干燥贮藏的广金钱草花粉萌发率较湿润贮藏条件下的高,短期内(24h)以室温贮藏的广金钱草花粉萌发率降低较慢,72~168h各贮藏条件下均大幅度降低,其中,以4℃干燥贮藏条件下花粉活力显著高于其它贮藏条件,长期贮藏时4℃干燥条件下更有利于花粉活力的保持。

参考文献

- [1] 蒙爱东. 药用植物广金钱草的研究进展[J]. 广西科学院学报, 2008, 24(2): 148-151.
- [2] 刘天竹, 陆海玲, 张惠, 等. 复方广金钱草颗粒对肾结石的影响及其利尿、抗炎镇痛作用[J]. 广东药学院学报, 2014, 30(6):

735-739.

- [3] 杨全, 李书渊, 程轩轩, 等. 广金钱草资源调查与药材质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 13(9): 147-150.
- [4] 杨全, 卢挺, 桑雪雨, 等. 不同种源地广金钱草药材质量变异与遗传多样性分析[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(9): 1344-1348.
- [5] 唐晓敏, 程轩轩, 杨全, 等. 广金钱草种子萌发特性及种子硬实研究[J]. 种子, 2014, 33(3): 78-81.
- [6] 杨全, 唐晓敏, 程轩轩, 等. 氮磷钾施肥对广金钱草生长和夏佛塔苷含量影响的研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29(4): 206-209.
- [7] 卢挺, 杨全, 唐晓敏, 等. 氮磷钾配比施肥对广金钱草产量及质量的影响[J]. 广西植物, 2014, 34(3): 426-430.
- [8] 潘海运, 唐晓敏, 杨全, 等. 广金钱草生殖生物学探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(10): 34-36.
- [9] 邓旭, 付辉, 谭济才. 2种羊蹄甲植物花粉活力快速测定[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(19): 8071-8073, 8011.
- [10] DAFNI A. Pollination ecology [M]. New York: Oxford University Press, 1992: 1-57.
- [11] 陈郡雯, 吴卫, 侯凯, 等. 川白芷与祁白芷花粉活力及柱头可授性测定[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(22): 3079-3082.
- [12] 李娅琼, 古今. 滇龙胆花粉生活力的快速测定[J]. 云南中医学院学报, 2009, 32(2): 42-44.
- [13] 孙玉琴, 黄天卫, 杨莉, 等. 三七及屏边三七花粉不同贮存条件生活力测定[J]. 文山学院学报, 2012, 25(6): 19-21.
- [14] 杜玉虎, 张绍铃, 姜雪婷, 等. 果梅花粉离体萌发及花粉管生长特性研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(9): 1846-1852.
- [15] 王钦丽, 卢斗龙, 吴小琴, 等. 花粉的保存及其生活力测定[J]. 植物学通报, 2002, 19(3): 365-373.
- [16] MAYAR E, GOTTSBERGER G. Pollen viability in the genus silene and its evaluation by means of different test procedures[J]. Flora, 2000, 195: 349-353.
- [17] 刘林德, 张洪军, 祝宁, 等. 刺五加花粉活力和柱头可授性的研究[J]. 植物研究, 2001, 21(3): 375-379.
- [18] 胡晋. 花粉的保存和生活力测定[J]. 种子, 1992, 12(6): 33-36.
- [19] 尹佳蕾, 赵惠恩. 花粉生活力影响因素及花粉贮藏概述[J]. 中国农学通报, 2005, 21(4): 110-113.
- [20] 孙霞, 邢世岩, 路冬, 等. 银杏花粉活力研究[J]. 果树科学, 1998, 15(1): 58-64.

Vitality Determination and Storage Method for Pollen of *Desmodium styracifolium*

TANG Xiaomin, CHENG Xuanxuan, ZHANG Chunrong, PAN Haiyun, YANG Quan

(School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510006)

Abstract: The pollens of *Desmodium styracifolium* were employed as experimental material to study the effects of test methods and storage conditions on pollen vitality of *D. styracifolium* by staining

doi:10.11937/bfyy.20170390

忍冬不同器官有效成分分析

崔旭盛^{1,2}, 马召^{1,2}, 田清存¹, 高秀强¹, 郭玉海²

(1. 石家庄以岭药业股份有限公司, 河北 石家庄 050035; 2. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100193)

摘要:以忍冬为试验材料,采用高效液相色谱法测定了有效成分含量、积累量及所占比例,分析了不同器官有效成分。结果表明:忍冬花绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 和总异绿原酸含量最高,分别可达 41.65、0.21、0.27、9.11、1.42、10.80 mg·g⁻¹;忍冬叶木犀草苷含量最高,为 1.23 mg·g⁻¹;忍冬花绿原酸、异绿原酸 B、总异绿原酸积累量最高,分别高达 309.88、67.78、80.35 mg·株⁻¹;忍冬叶咖啡酸、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C 积累量最高,分别可达 2.92、27.63、3.82、21.56 mg·株⁻¹;忍冬不同器官间有效成分比例不同。综合以上结果可知,忍冬各器官间有效成分存在差异,忍冬叶富含的多种有效成分值得开发利用。

关键词:忍冬;器官;有效成分

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)21-0150-05

忍冬科(Caprifoliaceae)忍冬属(*Lonicera*)植物忍冬(*Lonicera japonica* Thunb)是著名的清热

解毒类药材,并且忍冬花和忍冬藤均已被写入中国药典^[1]。忍冬体内含有挥发油、黄酮类、有机酸、萜类、多酚类、氨基酸以及维生素等多种成分^[2-6]。并在食品、药品和化妆品等领域有广泛的用途^[7-9]。

近年来,有关忍冬的研究已经建立了分光光度法、GC-MS、HPLC 等多种成分的测定方法^[10-12],并探明忍冬品种、种植地区、忍冬部位及加工方式均会对忍冬体内药用成分产生影响^[8,13-20]。但是相关研究绝大多数都把忍冬花(金银花)作为研究重点,而有关忍冬藤以及忍冬其它器官的药用成分和药理药效的研究甚少。

第一作者简介:崔旭盛(1986-),男,博士,农艺师,现主要从事药材资源和基地建设等研究工作。E-mail:cuixushengangel@163.com.

责任作者:郭玉海(1956-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事药用作物栽培等研究工作。E-mail:yhguo@cau.edu.cn.

基金项目:国家中药标准化资助项目(ZYBZH-C-HEB-12);国家科技富民强县资助项目。

收稿日期:2017-04-17

method and culturation *in vitro*. The results showed that, the pollen vitality of *D. styracifolium* could be determined quickly by staining method, which was lower than that of culturation method *in vitro*. The optimal medium was 15% sucrose+0.01% H₃BO₃+0.09% Ca(NO₃)₂·4H₂O+0.01% MgSO₄·7H₂O, in which the rate of germination was 96.16%, length of pollen tube was 541.72 μm; 72-168 hours storage under 4 °C dry condition, it was good for the vitality maintenance of *D. styracifolium* pollens. The vitality of pollens dried by silicone was higher than the moist pollens. Culturation method *in vitro* was the most suitable method for *D. styracifolium* pollen viability determination, 4 °C dry condition contributes was suitable for maintaining the pollen vitality of *D. styracifolium*.

Keywords: *Desmodium styracifolium*; pollen vitality; storage method