



# 濒危药用植物茅苍术花粉形态、活力测定及贮存研究

李琳, 谷巍\*, 巢建国, 高杰, 周娟娟, 申修源

(南京中医药大学药学院, 江苏南京 210046)

**[摘要]** 目的:研究濒危药用植物茅苍术花粉形态、活力测定及贮存。方法:采用扫描电镜观察茅苍术花粉形态,用液体培养及染色法筛选花粉萌发最适培养基及活力测定方法,并检测不同贮存条件下花粉的活力。结果:茅苍术花粉粒呈类球形,具3萌发沟,外壁表面具刺状雕纹;在 $ME_3 + 16\% PEG_{4000} + 10\%$ 蔗糖液体培养基上花粉萌发率最高,达62.1%,而其他3种染色法均不宜用于茅苍术花粉活力的检测;低温可明显延长茅苍术花粉的贮存时间,在 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 低温下可贮存60 d。结论:液体培养法适于茅苍术花粉活力的测定,花粉萌发率与贮存温度及时间密切相关,本研究为茅苍术人工辅助授粉及野生抚育研究提供了科学的依据。

**[关键词]** 茅苍术;花粉形态;花粉活力;贮存

茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 为菊科多年生草本植物,其根茎具有燥湿健脾、祛风散寒、明目等功效,为临床常用药之一,是江苏省著名道地药材,被广泛公认为优质的苍术商品,特别是以产于江苏句容茅山一带的质量最优。近年来由于人为因素及其自身的生物学特性如结实率低及种群自身恢复能力较差等原因,其分布区及种群数量呈现明显的衰退倾向,已列为江苏省4种濒危药用植物之一<sup>[1-3]</sup>。

为此,作者进行了茅苍术野生抚育研究,结果表明人工辅助授粉可以显著地提高野生茅苍术特别是雌花的结实率<sup>[2]</sup>。花粉活力是指花粉具有存活、生长、萌发或发育的能力,对人工辅助授粉有着重要的影响。茅苍术花粉属三核型花粉,外壁较薄,对外界不良条件敏感且抵抗力较差,寿命短,保存困难<sup>[4-6]</sup>。而茅苍术属异花授粉植物,两性花和单性花异株,且单性花均为雌花,这使得雌蕊很难受精,往往在雌花的花期,两性花已经进入终花期,异花授粉困难<sup>[3]</sup>。为此,本文对茅苍术花粉的形态、活力测定及贮存特性进行了研究,旨在为茅苍术人工辅助授粉及野生抚育研究提供理论依据,以促进这一优良种质资源

的保存和可持续利用。

## 1 材料

茅苍术采自江苏句容茅山,经南京中医药大学中药资源学教研室谷巍副教授鉴定为菊科植物茅苍术 *A. lancea*。于晴天上午9:00时采集盛开的两性花花药,装入离心管中,避光,备用。

## 2 方法

### 2.1 茅苍术花粉形态观察

取新鲜花药,将花粉直接涂于粘有双面胶带的小金属台上,用SBC-12小型离子测射仪喷金处理,在KYKY 1000B型扫描电镜(SEM)下观测其形态和大小,选取典型的花粉粒拍照记录并描述花粉形状和外壁纹饰。

### 2.2 茅苍术花粉液体培养研究

花粉萌发试验采用液体培养法,为筛选最适培养基,设置不同组分培养基:①蔗糖处理,质量分数分别为5%,10%,15%,20%,25%,30%,40%,50%。② $ME_3$ 处理,采用改良的Monnier( $ME_3$ )培养基,即 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  370,  $KNO_3$  950,  $KH_2PO_4$  85,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  880,  $NH_4NO_3$  412.5,  $KCl$  175,  $H_3BO_3$  50,  $Na_2EDTA$  7.45,  $KI$  0.83,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0.25,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.025,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  0.025,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.025,  $VitB_1$  1.0,  $VitB_6$  1.0(单位均为 $mg \cdot L^{-1}$ )。③聚乙二醇4000( $PEG_{4000}$ )处理, $PEG_{4000}$ 质量分数分别为8%,12%,16%,20%,24%。④不同浓度 $PEG_{4000}$ 与 $ME_3$ 处理,在所有培养基中先加入 $ME_3$ ,再分别加入不同质量分数的

**[稿件编号]** 20111214008

**[基金项目]** 国家中医药管理局基金项目(06-07ZP19);江苏省高校优势学科建设工程项目(ysxk-2010);江苏省“青蓝工程”项目(2008)

**[通信作者]** \*谷巍, Tel: (025) 85811514, E-mail: guwei9926@yahoo.com.cn



PEG<sub>4000</sub> (8%, 12%, 16%, 20%, 24%)。⑤ 16% PEG<sub>4000</sub> 与不同浓度蔗糖处理, 在所有培养基中先加入 16% PEG<sub>4000</sub>, 再分别加入不同质量分数的蔗糖 (5%, 10%, 15%, 20%, 25%)。⑥ 不同浓度 PEG<sub>4000</sub>、蔗糖与 ME<sub>3</sub> 处理, 在所有培养基中先加入 ME<sub>3</sub>, 再分别加入不同质量分数的 PEG<sub>4000</sub> (8%, 12%, 16%, 20%, 24%) 与不同质量分数的蔗糖 (5%, 10%, 15%, 20%, 25%), 共计 25 组。

将以上配好的液体培养基 (pH 5.8) 滴加到带凹槽的载玻片上, 洒播花粉后置于铺有 2 层湿滤纸的培养皿中, 在 25 °C 的培养箱中培养 12 h 后, 观察统计萌发和未萌发的花粉数, 以花粉管长度等于或大于花粉直径者为萌发。各处理 3 次重复, 每重复统计花粉数不少于 100 粒, 计算萌发率。萌发率 = (视野萌发花粉粒数/视野总花粉粒数) × 100%。试验数据采用 SPSS 16.0 统计分析。

### 2.3 花粉染色法

**2.3.1 氯化三苯基四氮唑 (TTC) 测定法** 取少量花粉置于载玻片上, 加 2~3 滴 0.5% TTC 溶液, 盖上盖玻片, 放入 25 °C 恒温箱中, 10~15min 后置于显微镜下观察。

**2.3.2 碘-碘化钾法 (I<sub>2</sub>-KI) 测定法** 取少量花粉置于载玻片上, 加 2~3 滴 I<sub>2</sub>-KI 溶液, 培养与观察同 TTC 法。

**2.3.3 亚甲基蓝测定法** 取少量花粉置于载玻片上, 加 2~3 滴 0.1% 亚甲基蓝溶液, 培养与观察同 TTC 法。

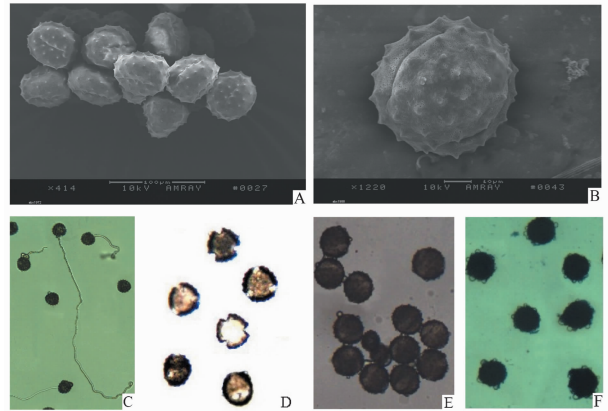
### 2.4 花粉贮存与活力测定

将混合均匀的新鲜花粉用硫酸纸包好, 设计不同贮存温度: 20, 4, -20, -80 °C; 分别在第 2, 4, 6, 10, 15, 30, 40, 50, 60 天用筛选出的最佳液体培养基培养, 并测定其活力。

## 3 结果与分析

### 3.1 茅苍术花粉的形态

经扫描电镜观察, 茅苍术花粉粒呈类球形, 赤道面观椭圆形, 极面观 3 裂圆形, 具 3 萌发沟, 外壁表面具刺状雕纹, 刺渐尖, 尖端无网孔, 其他部分及周围有网孔。花粉粒平均极轴长 (59.37 ± 4.3) μm, 平均赤道轴长 (48.62 ± 3.5) μm, P/E ≈ 1.22 (图 1)。



A, B. 花粉电镜照片; C. 花粉萌发照片; D. TTC 染色照片; E. I<sub>2</sub>-KI 染色照片; F. 亚甲基蓝染色照片。

图 1 茅苍术花粉的形态及染色

Fig. 1 *Atractylodes lancea* pollen form and staining photo

### 3.2 液体培养法对茅苍术花粉萌发的影响

**3.2.1 ME<sub>3</sub>、蔗糖及 PEG<sub>4000</sub> 单一组分培养基对花粉萌发的影响** 花粉萌发结果表明, 茅苍术花粉在 ME<sub>3</sub> 培养基及不同浓度蔗糖培养基上均未萌发, 而在不同浓度 PEG<sub>4000</sub> 培养基上均有萌发, 萌发率呈先升后降的趋势, 16% PEG<sub>4000</sub> 时最高, 达到了 38.6% (表 1)。

表 1 不同浓度 PEG<sub>4000</sub>, 及其与 ME<sub>3</sub> 处理对花粉萌发率的影响

Table 1 Pollen germination capacity in culture media with different concentration PEG<sub>4000</sub> and ME<sub>3</sub> + different concentration PEG<sub>4000</sub> %

PEG <sub>4000</sub> 质量分数/%	萌发率	
	培养基中未加入 ME <sub>3</sub>	培养基中加入 ME <sub>3</sub>
8	29.7 ± 4.2 Cd	32.2 ± 5.5 Ccd
12	32.4 ± 2.1 Ccd	35.1 ± 2.5 BCc
16	38.6 ± 1.5 BCbc	49.3 ± 4.1 Aa
20	37.2 ± 2.0 BCbc	40.6 ± 2.5 Bb
24	34.8 ± 1.9 BCcd	40.2 ± 2.3 Bbc

注: 不同大、小写字母分别表示在 0.01, 0.05 水平上存在差异 (表 2 同)。

**3.2.2 不同浓度 PEG<sub>4000</sub> 与 ME<sub>3</sub> 处理对花粉萌发的影响** 在不同浓度 PEG<sub>4000</sub> 中加入 ME<sub>3</sub> 花粉萌发率均有所提高, 亦在 16% PEG<sub>4000</sub> 时最高, 达到了 49.3% (表 1)。

**3.2.3 16% PEG<sub>4000</sub> 与不同浓度蔗糖处理对花粉萌发的影响** 在 16% PEG<sub>4000</sub> 的基础上添加一定量的



蔗糖可促进花粉的萌发,萌发率在低浓度条件下,随蔗糖浓度增加而增加,当蔗糖超过一定浓度(10%)后,则抑制花粉萌发(表 2)。

表 2 16% PEG<sub>4000</sub> 与不同浓度蔗糖处理对花粉萌发率的影响

Table 2 Pollen germination capacity in culture media with 16% PEG<sub>4000</sub> and different concentration sucrose %

培养基中蔗糖的质量分数/%	萌发率
5	53.2 ± 3.1 ABa
10	56.6 ± 2.3 Aa
15	46.7 ± 3.3 Bb
20	44.1 ± 4.1 Bb
25	43.5 ± 4.0 Bb

3.2.4 不同浓度 PEG<sub>4000</sub>、蔗糖与 ME<sub>3</sub> 处理对花粉萌发率的影响 花粉在所有 3 个成分组合的培养液上均能萌发,其中在 ME<sub>3</sub> + 16% PEG + 10% 蔗糖的培养液上萌发率最高,达到了 62.1% (图 2)。

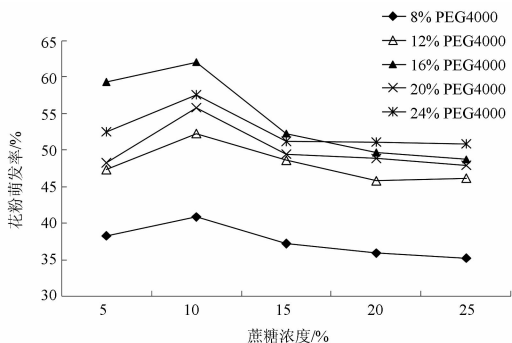


图 2 不同浓度 PEG<sub>4000</sub>、蔗糖与 ME<sub>3</sub> 处理对花粉萌发率的影响

Fig. 2 Pollen germination capacity in culture media with different concentration PEG<sub>4000</sub>, sucrose and ME<sub>3</sub>

### 3.3 不同染色方法检测花粉活力

TTC 染色是一种鉴定去氢酶活性的组织化学反应,凡具有活力的花粉在其呼吸过程中可将 TTC 由无色的氧化型变成红色的还原型,茅苍术花粉均未染色;I<sub>2</sub>-KI 法是利用新鲜的花粉有淀粉积累,遇碘呈蓝色来检测花粉的活力。茅苍术花粉均未染成蓝色而呈黄褐色;亚甲基蓝则是根据花粉粒的胞质存在与否判断其活力,有胞质的花粉被染为蓝色。茅苍术花粉均被染成蓝色,未成熟和败育花粉也正常着色(图 1)。TTC 法、I<sub>2</sub>-KI 法、亚甲基蓝法均不适

用于作为测定茅苍术花粉活力的方法。

### 3.4 花粉贮存活力的测定

花粉贮存结果表明,茅苍术花粉萌发率随着贮存时间的延长呈下降趋势,而低温可明显延长茅苍术花粉的贮存时间。20 °C 贮存的花粉第 4 天活力降至 4.7%,第 6 天则完全丧失;而在 -80 °C 低温下,茅苍术花粉可贮存 60 d(图 3)。

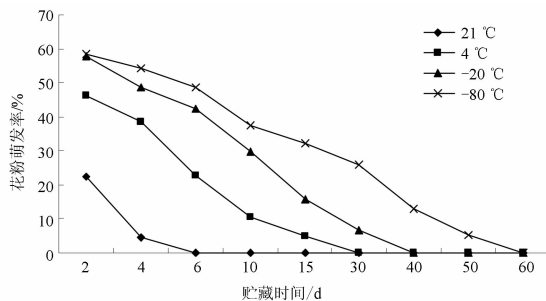


图 3 花粉贮存期间活力的变化

Fig. 3 The change of pollen germination capacity in different storage conditions

## 4 讨论

花粉的形态特征是植物在长期的进化过程中演化、发展而形成的,受环境条件影响小,较为保守,具有固定的轮廓、雕纹、萌发孔(沟)数和表面纹饰。茅苍术花粉表面饰纹及形状具有菊科植物花粉的典型特征<sup>[7-8]</sup>,研究工作为野生茅苍术这一优良品种的选育及种质资源保护提供科学的依据。

在茅苍术花粉液体培养试验中,蔗糖与 ME<sub>3</sub> 单组分培养基均不能使茅苍术花粉萌发,只有添加了 PEG 花粉才能萌发,PEG 是茅苍术花粉萌发的关键因素。在花粉萌发中,PEG 能够使花粉粒内膜结构发生变化,产生高渗透压,花粉管较易萌发和生长;且 PEG 能使花粉粒细胞膜柔软性及通透性提高,促进对外源物质的吸收<sup>[9]</sup>,因此,茅苍术花粉萌发率在添加了 ME<sub>3</sub> 与蔗糖的 PEG 培养基中比单纯的 PEG 培养基高,ME<sub>3</sub> 与蔗糖对茅苍术花粉萌发起促进作用。

本文采用的 3 种染色法均不适于茅苍术花粉活力的测定,这与花粉壁的厚薄、花粉外壁的组成物质及花粉内各种酶活性的强弱等花粉自身特性相关。TTC 及 I<sub>2</sub>-KI 溶液均未能使茅苍术花粉着色,可能是由于茅苍术花粉壁对这 2 种溶液具有限制作用,染色溶液不能进入原生质体,使花粉不能着色<sup>[10]</sup>;在亚甲基蓝溶液作用下茅苍术花粉均呈蓝色,但具有



胞质的花粉粒并不一定具有受精能力,该方法不能区分出未成熟和败育花粉。

花粉是种子植物的雄配子体,其活力对授粉受精有着重要的影响。温度是影响花粉贮存的重要因素,低温可降低花粉呼吸作用及其他生理功能,有利于花粉较长时间保存活力<sup>[4]</sup>。常温条件下,茅苍术花粉活力在第6天时完全丧失,通常雌花与两性花花期不一致,这使得茅苍术异花授粉愈加困难。低温可明显延长茅苍术花粉的贮存时间,在-80℃低温下,茅苍术花粉可贮存60d,研究结果为有效解决茅苍术异花授粉困难提供了保障,为茅苍术野生抚育研究提供了科学依据,促进了这一优良种质资源的保存和可持续利用。

[参考文献]

- [1] 张恩迪. 中国濒危野生药用动植物资源的保护[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2000:59.  
[2] 谷巍, 巢建国, 张莹, 等. 濒危药用植物茅苍术野生抚育技

- 术研究[J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(4):248.  
[3] 陶燕, 巢建国, 候芳洁. 茅苍术人工辅助授粉的初步研究[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(2):383.  
[4] 王钦丽, 卢龙斗, 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.  
[5] 左丹丹, 明军, 刘春, 等. 植物花粉生活力检测技术进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(16): 4742.  
[6] 赵宏波, 陈发棣, 房伟民. 栽培小菊和几种菊属植物花粉离体萌发研究[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(2):22.  
[7] 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.  
[8] 王桃银, 郭巧生. 药用菊花不同栽培类型花粉形态比较研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(2):109.  
[9] Yang J, Endo M. *In vitro* germination and viability of *Dendranthema* pollen [J]. *Asian J Plant Sci*, 2005, 4(6):673.  
[10] 赵宏波, 陈发棣, 房伟民. 菊属植物花粉生活力检测方法的比较[J]. 浙江林学院学报, 2006, 23(4):406.

## Pollen morphological characteristics, viability test and storage of endangered medicinal plant *Atractylodes lancea*

LI Lin, GU Wei\*, CHAO Jianguo, GAO Jie, ZHOU Juanjuan, SHEN Xiuyuan

(School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the pollen morphological characteristics, viability test and storage character of the endangered plant *Atractylodes lancea*. **Method:** Pollen grains morphologies of *A. lancea* were observed by scanning electron microscope. The optimum culture medium and viability determination methods were screened out by liquid culture and dyeing methods, and then the pollen germination capacities in different storage conditions were detected. **Result:** The pollen grains are quasi-spherical, with tricolpate and spinous sculpture. The optimal culture medium was ME<sub>3</sub> + 16% PEG<sub>4000</sub> + 10% sucrose, in which the pollen germination capacity reached to 62.1%, while the other three dyeing methods were not able to be applied to detecting the pollen viability of *A. lancea*. The low storage temperature could significantly prolong the storage time of pollen of *A. lancea*. At -80℃, pollen viability could be maintained for 60 days. **Conclusion:** Liquid culture method is suitable for the determination of pollen germination of *A. lancea*, and the rate of pollen germination is closely related to the storage time and temperature. At last, this study provides a foundation for the artificial pollination and cultivating in wildness of *A. lancea*.

[Key words] *Atractylodes lancea*; pollen grains morphological characteristics; pollen viability; storage

doi:10.4268/cjmm20121108

[责任编辑 吕冬梅]