

## 两面针花粉活性与形态特征研究

刘保财<sup>1,2</sup>, 黄颖桢<sup>1,2</sup>, 赵云青<sup>1,2</sup>, 陈菁瑛<sup>1,2\*</sup>

1. 福建省农业科学院 农业生物资源研究所, 福建 福州 350003

2. 福建省农业科学院 药用植物研究中心, 福建 福州 350003

**摘要:**目的 进一步认识两面针 *Zanthoxylum nitidum* 花粉粒形态特征和生理特性。方法 采用离体培养法测定花粉粒活性, 并应用“3414”试验设计对培养条件: 蔗糖质量分数、硼酸(H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)质量浓度、氯化钙(CaCl<sub>2</sub>)质量浓度3个因素进行筛选, 同时与碘-碘化钾(I<sub>2</sub>-KI)、氯化三苯基四氮唑(TTC法)测定花粉活性的方法比较, 建立测定花粉活性的适宜方法。然后应用所建立的方法, 进一步研究保存方法、保存时间对花粉粒活性影响。应用电子显微镜观察花粉粒大小、形态等特征。结果 I<sub>2</sub>-KI染色法、TTC法2种方法不适合两面针成熟花粉活性的测定。离体萌发法中最佳的组合为10%蔗糖+0.1 mg/mL硼酸+0.1 mg/mL氯化钙, 测定萌发率可达66.67%。两面针花粉活性24 h内最高, 4℃的低温条件下可保持约15 d, 而冷冻和常温条件不太适合其保存。花粉粒形态为长椭球形, 具有3个萌发沟, 表面有网状纹饰。结论 初步建立了两面针花粉粒活性测定方法、贮藏条件, 为了解两面针花粉粒生理特性、品种选育及分类奠定基础。

**关键词:** 两面针; 花粉粒; 活性; 形态特征; 碘-碘化钾; 氯化三苯基四氮唑法

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)09-1589-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.09.024

## Study on pollen viability and morphological characteristics of *Zanthoxylum nitidum*

LIU Bao-cai<sup>1,2</sup>, HUANG Ying-zhen<sup>1,2</sup>, ZHAO Yun-qing<sup>1,2</sup>, CHEN Jing-ying<sup>1,2</sup>

1. Institute of Agricultural Bioresource, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China

2. Research Center for Medicinal Plant, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China

**Abstract: Objective** To investigate the pollen morphological and physiological characteristics of *Zanthoxylum nitidum*. **Methods** The pollen grain viability was studied using an *in vitro* method and the optimal concentration of sucrose, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, and CaCl<sub>2</sub> on pollen germination were investigated by 3414 test. At the same time it contrasted with the I<sub>2</sub>-KI and TTC methods to find the proper determination method for *Z. nitidum* pollen vitality. And then It was further studied that different storage time and methods had an effect on pollen grain viability by having established method. Pollen morphology was studied by scanning electron microscopy (SEM). **Results** The I<sub>2</sub>-KI and TTC methods were not fit for determining the mature pollen vitality of *Z. nitidum*. The optimal medium was 10% sucrose + 0.1 mg/mL H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> + 0.1 mg/mL CaCl<sub>2</sub> on pollen germination *in vitro* and the pollen germination ratio was up to 66.67%. Pollen viability was the highest in 24 h and it could keep about 15 d in 4℃ environments. The pollen grains were 3-colpate prolate, with reticulate ornamentation. **Conclusion** The determination and storage of pollen grain viability is established preliminarily to provide reliable basis of knowing physiological characteristics, breeding and taxonomy.

**Key words:** *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC.; pollen; viability; morphology; I<sub>2</sub>-KI; TTC method

两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 为芸香科 (Rutaceae) 花椒属 *Zanthoxylum* L. 木质藤本植物, 俗称钉板刺、入山虎、入地金牛、叶下穿针等, 其根、茎、叶、果皮均可入药, 但通常以根入药<sup>[1]</sup>。其根性平, 味苦、辛, 具有活血化瘀、行气

止痛、解毒消肿的功能; 主要用于跌扑损伤、胃痛、牙痛、风湿痹痛、毒蛇咬伤, 外治烧烫伤<sup>[2]</sup>; 是外感风痧冲剂、金鸡系列、骨刺片、跌打万花油、两面针中药牙膏等药品和日用品的重要原料。现代药理研究证明其在抗癌、消炎等方面作用显著<sup>[3-6]</sup>。

收稿日期: 2015-06-19

基金项目: 福建中药种质资源保护利用与共享平台 (2008Y2003); 福建省农科院创新团队建设项目 (CXTD-2-1315)

作者简介: 刘保财 (1985—), 男, 硕士, 研究实习员, 主要从事中草药繁殖、育种与栽培方面研究。E-mail: 626813844@qq.com

\*通信作者 陈菁瑛 (1966—), 女, 研究员, 主要从事药用植物资源利用等方面的研究。E-mail: cgy6601@163.com

两面针主要分布于我国广西、广东、云南、福建、湖南、台湾等地，生于山野坡地灌木丛中，以广西的资源最为丰富<sup>[7-8]</sup>。近年来，由于过度开发经济林以及烧山和除草剂的大量应用，两面针生境受到严重破坏，加上乱采乱挖、繁殖率低、生长缓慢等因素，使其野生蕴藏量急剧下降，人工栽培已迫在眉睫。近几年对其研究主要集中于化学成分、药理作用方面，对其繁育栽培方面的基础研究报道甚少，本实验首次对两面针的花粉进行研究，为其育种、栽培、分类研究奠定基础。

### 1 试验材料

样品取自福建省福州市金山，经中国医学科学院药用植物所林雨霖教授鉴定为两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC.。选择盛花期的枝条带回室内，作为试验材料备用。

### 2 方法

选择刚开放的花蕾，用于花粉活性、形态特征测定。

#### 2.1 花粉活性测定

采用碘-碘化钾 (I<sub>2</sub>-KI) 染色法、氯化三苯基四氮唑 (TTC 法) 和离体萌发法对花粉活性进行测定。I<sub>2</sub>-KI 染色法、TTC 法参照《植物生理生化试验原理和技术》<sup>[9]</sup>，染色后，置于 10 倍显微镜下观察，每张片上统计 100 个，记录发芽数，重复 3 次。

萌发采用琼脂培养法，对蔗糖质量分数、硼酸质量浓度、氯化钙质量浓度 3 个因素进行筛选，蔗糖质量分数为 0、5%、10%、20%，硼酸质量浓度为 0、0.05、0.1、0.2 mg/mL，氯化钙质量浓度为 0、0.05、0.1、0.2 mg/mL，3 个因素 4 水平，故采用了“3414”的试验处理，其组合情况见表 1，并与常规 BK 培养基<sup>[10]</sup>作比较，筛选出适宜两面针花粉萌发的培养基。各处理按表 1 组合配好后，分别加入 0.5% 的琼脂，然后煮沸，使琼脂溶解，均匀滴在载玻片中间，冷却后，将上述花粉，散在培养基上面。4 h 后，置于 10 倍显微镜下，每张片上统计 100 粒，记录萌发的粒数，重复 3 次。

#### 2.2 贮藏方法和时间的筛选

于 2014 年 4 月在同一植株上再次采摘盛花期枝条，带回室内，选择刚开放的花药，放入信封内，置于常温（自然室内）、低温（4℃冰箱）、冷冻（-20℃冰箱）环境下，每天上午 11 点左右取样，并将花粉均匀涂在铺有适宜培养基的载玻片上，培养方法、观察统计方法同“2.1”项离体萌发法，连续测定 14 d。

表 1 “3414”各处理组合

Table 1 Each treatment combination of 3414 test

| 处理 | 蔗糖/% | 硼酸/(mg·mL <sup>-1</sup> ) | 氯化钙/(mg·mL <sup>-1</sup> ) |
|----|------|---------------------------|----------------------------|
| 1  | 0    | 0.00                      | 0.00                       |
| 2  | 0    | 0.10                      | 0.10                       |
| 3  | 5    | 0.10                      | 0.10                       |
| 4  | 10   | 0.00                      | 0.10                       |
| 5  | 10   | 0.05                      | 0.10                       |
| 6  | 10   | 0.10                      | 0.10                       |
| 7  | 10   | 0.20                      | 0.10                       |
| 8  | 10   | 0.10                      | 0.00                       |
| 9  | 10   | 0.10                      | 0.05                       |
| 10 | 10   | 0.10                      | 0.20                       |
| 11 | 20   | 0.10                      | 0.10                       |
| 12 | 5    | 0.05                      | 0.10                       |
| 13 | 5    | 0.10                      | 0.05                       |
| 14 | 10   | 0.05                      | 0.05                       |

### 2.3 花粉形态特征观察

将花粉均匀弹撒在带有双面导电胶的载物铜台上，放入 JEOL JFC-1600 离子溅射仪中喷镀铂金，置于 JSM-6390 LV 扫描电镜下观察，并选有代表性的视野 500×（群体）、3 000×（个体）、10 000×（局部）3 种类型拍照记录。选择 20 个有代表性的花粉粒，测量其极轴长和赤道轴长，计算均值和极赤比；观察花粉表面纹饰及萌发沟形态。

### 2.4 数据统计与处理

将不同处理的实验数据汇总于 Excel 2007 中，运用 SAS 9.2 进行统计分析。

## 3 结果

### 3.1 TTC 法测定花粉活性

用 TTC 对刚开放花朵的花粉粒进行染色，实验结果表明，没有观察到花粉粒被染为红色或淡红色，均为黄色（图 1），所以此方法不适合测定两面针的花粉活性。

### 3.2 I<sub>2</sub>-KI 染色法测定花粉活性

用 I<sub>2</sub>-KI 进行染色，仅有 6% 的花粉粒染为蓝色，其他均为黄色（图 2），从实验结果可知该方法不能有效地反映两面针的花粉活性。

### 3.3 离体萌发培养法测定花粉萌发率

花粉管萌发情况见图 3。处理 6 的萌发率最高，可达 66.67%，显著高于空白和常规 BK 培养基，离体萌发培养法各处理的花粉萌发率结果见表 2。

**3.3.1 蔗糖质量分数对花粉萌发率的影响** 表 1 中的处理 2、3、6、11，氯化钙和硼酸质量浓度保持不变，并处于中等水平，因此可单独考虑蔗糖质量分数对花

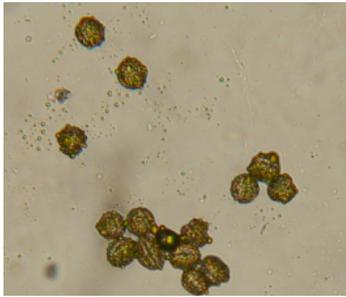


图1 TTC法测定花粉活性

Fig. 1 Determination of pollen activity by TTC method

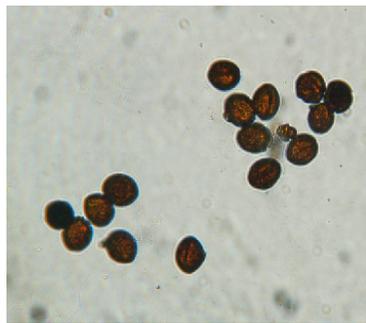


图2 I<sub>2</sub>-KI法测定花粉活性

Fig. 2 Determination of pollen activity by I<sub>2</sub>-KI method



图3 离体萌发的花粉粒及花粉管

Fig. 3 Germination of pollen grain and pollen tube *in vitro*

粉萌发率的影响。由表1和3可见,添加蔗糖的处理6、11高于不添加蔗糖处理2和不添加任何物质的处理1,并且随着蔗糖的添加量增加,萌发的数目也逐渐增加。当蔗糖质量分数增加到10%时,萌发率最高达到66.67%,增加到20%时,萌发率为63.33%,两者差异不大,但两者均显著高于不加蔗糖、含有5%蔗糖以及没有添加任何物质的处理1和BK。

**3.3.2 硼酸质量浓度对花粉萌发率的影响** 表1中的处理4、5、6、7,蔗糖质量分数和氯化钙质量浓度保持不变,并处于中等水平,因此可单独考虑硼酸质量浓度对花粉萌发率的影响。表1和4的结果表明花粉萌发率随着硼酸质量浓度的增

表2 离体培养法各处理的花粉萌发率结果

Table 2 Pollen grain germination results of each treatment in culture of *in vitro*

| 处理 | 萌发率/% |      |      |       | F 值  | Pr>F     | 多重比较 |
|----|-------|------|------|-------|------|----------|------|
|    | 重复 1  | 重复 2 | 重复 3 | 平均值   |      |          |      |
| 1  | 12    | 7    | 4    | 7.67  | 9.86 | <0.000 1 | F    |
| 2  | 27    | 12   | 19   | 19.33 |      |          | DEF  |
| 3  | 13    | 29   | 18   | 20.00 |      |          | DEF  |
| 4  | 27    | 37   | 46   | 36.67 |      |          | CD   |
| 5  | 34    | 43   | 53   | 43.33 |      |          | BC   |
| 6  | 54    | 82   | 64   | 66.67 |      |          | A    |
| 7  | 16    | 37   | 18   | 23.67 |      |          | CDEF |
| 8  | 8     | 18   | 14   | 13.33 |      |          | EF   |
| 9  | 29    | 43   | 48   | 40.00 |      |          | CD   |
| 10 | 14    | 32   | 19   | 21.67 |      |          | DEF  |
| 11 | 69    | 48   | 73   | 63.33 |      |          | AB   |
| 12 | 26    | 20   | 31   | 25.67 |      |          | CDEF |
| 13 | 28    | 34   | 25   | 29.00 |      |          | CDE  |
| 14 | 37    | 19   | 24   | 26.67 |      |          | CDEF |
| BK | 16    | 35   | 28   | 26.33 |      |          | CDEF |

不同字母表示差异显著  $P < 0.01$ , 下同

Different letters are significantly different  $P < 0.01$ , same as below

表 3 蔗糖质量分数对花粉萌发率的影响

Table 3 Effects of sucrose concentration on pollen grain germination

| 处理 | 萌发率/% | F 值   | Pr>F     | 多重比较 |
|----|-------|-------|----------|------|
| 1  | 7.67  | 18.13 | <0.000 1 | B    |
| 2  | 19.33 |       |          | B    |
| 3  | 20.00 |       |          | B    |
| 6  | 66.67 |       |          | A    |
| 11 | 63.33 |       |          | A    |
| BK | 26.33 |       |          | B    |

表 4 硼酸质量浓度对花粉萌发率的影响

Table 4 Effects of HBO<sub>3</sub> concentration on pollen grain germination

| 处理 | 萌发率/% | F 值   | Pr>F    | 多重比较 |
|----|-------|-------|---------|------|
| 1  | 7.67  | 11.64 | 0.000 3 | C    |
| 4  | 36.67 |       |         | B    |
| 5  | 43.33 |       |         | AB   |
| 6  | 66.67 |       |         | A    |
| 7  | 23.67 |       |         | BC   |
| BK | 26.33 |       |         | BC   |

加而增加, 0.10 mg/mL 时萌发率最大, 达到 66.67%, 高于其他处理。当质量浓度为 0.05 或 0.2 mg/mL 时, 均低于 0.1 mg/mL 的萌发率, 但与不添加硼酸的处理 4 和常规的 BK 差别不大, 与不添加任何物质的处理 1 差别较大。

**3.3.3 氯化钙质量浓度对花粉萌发率的影响** 处理 6、8、9、10, 蔗糖质量分数和硼酸质量浓度保持不变, 并处于中等水平, 即可单独考虑氯化钙质量浓度对花粉萌发率的影响。表 1 和 5 的实验结果表明花粉萌发率随着浓度的增加而增加, 0.1 mg/mL 氯化钙时萌发率最大, 达到 66.67%, 显著高于不添加任何成分的处理 1。含有 0.05 与 2.0 mg/mL 氯化钙 (处理 9、10)、常用的 BK 培养基之间没有显著差别, 但与处理 9 和处理 1 差异显著。处理 1 和处理 8 之间有一定的区别, 但均未达到显著程度。

**3.4 贮藏方法和时间对花粉活性影响**

将花粉粒在不同的环境下经过不同时间的贮藏, 花粉活性有显著的差别。从图 4 可知, 在所采用的 3 种贮藏方法中, 花粉活性都随着贮藏时间的延长而逐渐降低, 并且以 0~1 d 的下降速度最快, 即意味着 24 h 内花粉活性较高。两面针的花粉在不同的环境下进行贮藏亦表现出不同的活性, 其中 4 °C 低温贮藏的环境优于常温贮藏和冷冻贮藏, 其中

表 5 氯化钙浓度对花粉萌发率的影响

Table 5 Effects of CaCl<sub>2</sub> concentration on pollen grain germination

| 处理 | 均值/%  | F 值   | Pr>F    | 多重比较 |
|----|-------|-------|---------|------|
| 1  | 7.67  | 15.97 | 0.000 1 | C    |
| 6  | 66.67 |       |         | A    |
| 8  | 13.33 |       |         | C    |
| 9  | 40.00 |       |         | B    |
| 10 | 21.67 |       |         | BC   |
| BK | 26.33 |       |         | BC   |

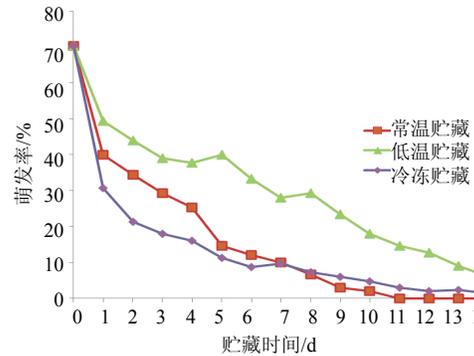


图 4 不同贮藏时间和方法对花粉粒活性的影响

Fig. 4 Effects of different storage time and methods on pollen grain germination

常温贮藏的寿命最短, 而冷冻贮藏的发芽率始终较低, 甚至在前 7 d, 冷冻贮藏的发芽率不仅低于低温贮藏也低于常温贮藏。在整个测定的时间段内, 低温贮藏条件下花粉发芽率始终高于另外 2 种环境, 并且低温贮藏条件下花粉粒不易散落, 而常温下花朵易于脱水干燥, 花粉粒易于散落, 不利于花粉粒在花药上的保存。在冷冻环境中花朵和花药均变硬, 花粉粒黏在花药上, 于常温中放置片刻后才变软, 但花粉粒经历冷冻与融化过程, 可能影响花粉的发芽率, 成为冷冻环境下花粉发芽率较低的原因之一。

**3.5 花粉形态特征研究**

通过形态特征观察, 两面针的花粉形态赤道面观为长椭球形, 极面观为 3 裂圆形, 极轴长 23~30.6 μm, 赤轴长 15.2~19.4 μm, 极赤比为 1.55; 基本上都具有 3 个萌发沟, 沟长 21.25~24.4 μm, 沟宽 2.4~4.0 μm; 表面均具有清楚的网状纹饰, 网孔大小不一, 多边形, 有些网孔内含有一些颗粒状物质 (图 5)。从花粉粒群体可知, 花粉粒饱满, 约有 2% 左右发育不良的花粉粒出现 (图 5)。

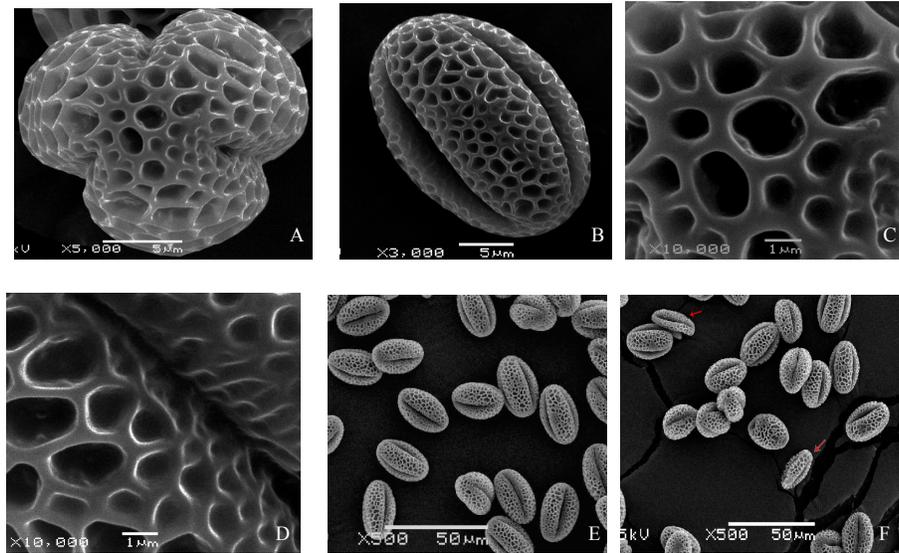


图 5 花粉粒的极面观 (A)、赤道面观 (B)、表面网孔 (C)、萌发沟 (D)、群体 (E)、发育不良花粉粒 (F)

Fig. 5 Polar view (A), equatorial face (B), reticulate ornamentation (C), germinal colpate (D), population (E), and dysplasia (F) of pollen grain

#### 4 讨论

测定花粉活性的方法有很多种,常用的有 TTC 法、I<sub>2</sub>-KI 法和离体萌发法。通过以上 3 种方法对两面针的花粉活性比较,结果表明 TTC 法无法测定两面针花粉粒活性,这可能是其内所含脱氢酶活性太低的原因; I<sub>2</sub>-KI 法在一定程度上反映了其活性,但仅有 6%的萌发率,远低于离体萌发 66.67%的萌发率,这表明两面针花粉粒内所含的淀粉量较低。

“3414”试验设计吸收了回归最优设计处理少、效率高的优点,又符合各因素最佳浓度筛选<sup>[1]</sup>。本实验首次将“3414”试验设计应用于花粉萌发适宜条件筛选,借用了该设计处理少、效率高的优点,不仅减少处理的组合数,而且能够全面分析影响花粉萌发较大的 3 个主要因素。可把不同的处理挑选出来单独分析各个因素对两面针发芽率的影响。但也有不足之处,不能分析各因素对发芽率的贡献率,以及理想的最佳发芽组合仍需进一步改变各因素的水平,使不同因素的水平趋近最高发芽率,从而得到最优发芽组合。另外人工创造的离体发芽条件,与柱头上的发芽环境也可能不一样,因此上述离体发芽组合不能代表花粉在柱头上真正的发芽率,只能反映两面针花粉活性的大小,所以其最优且较理想的离体萌发条件有待进一步深入研究。

影响花粉寿命的有温度、湿度等自然因素,将两面针花粉置于不同的环境条件下贮藏,其寿命则长短不一。在本实验研究中以 4 °C 低温贮藏的环境

下保存两面针花粉最适合,这与其他物种的保存方法基本一致<sup>[12-13]</sup>。冷冻贮藏活性低,可能与两面针花粉不耐低温有关,具体原因有待进一步研究;越来越多用超低温保存花粉<sup>[4]</sup>,两面针的花粉能否用超低温保存,同样需要进一步研究。不同的年份所测得的花粉活性不同,这可能与取样时的环境有关。

不同成熟度花粉具有不同活性,两面针花序为聚伞圆锥花序<sup>[15]</sup>,开花期不一致,且当花粉从花药上开始散粉时,即意味着花粉成熟,其不同成熟度时期难以划分,故本实验未对不同成熟期花粉粒进行研究,但值得进一步探讨。

两面针的花粉形态赤道面观为长椭球形,极面观为 3 裂圆形,具有 3 个萌发沟,表面均具有清楚的网状纹饰等特征,与刘炳仑<sup>[16]</sup>所报道的花椒属花粉特征一致,两面针不同的类群间是否存在差别有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志 (第 43 卷, 第二分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 毛晓丽, 覃禹, 蔡 鹃, 等. 两面针红外指纹图谱与抗癌活性的谱效研究 [J]. 红外与毫米波学报, 2013, 32(1): 91-96.
- [4] Chen Z F, Liu Y C, Liu L M, *et al.* Potential new inorganic antitumor agents from combining the anticancer traditional Chinese medicine (TCM)

- liriodenine with metal ions, and DNA binding studies [J]. *Dalton Trans*, 2009, 2(2):262-272.
- [5] Nakanishi T, Suzuki M, Saimoto A, *et al*. Structural considerations of NK109, an antitumor benzo [c] phenanthridine alkaloid [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62: 864-867.
- [6] Holden J A, Wall M E, Wani M C, *et al*. Human DNA topoisomerase I: quantitative analysis of the effects of camptothecin analogs and the benzophenanthridine alkaloids nitidine and 6-ethoxydihydroxynitidine on DNA topoisomerase I-induced DNA strand breakage [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 370(1): 66-76.
- [7] 陈贝贝, 宋经元, 姚 辉, 等. 基于ITS2条形码的两面针药材及其混伪品的鉴别 [J]. *中草药*, 2013, 44(15): 2150-2154.
- [8] 蒋水元, 李 虹, 黄夕洋, 等. 两面针苗木分级标准的研究 [J]. *福建林业科技*, 2010, 37(4): 87-90.
- [9] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [10] 胡适宜. 植物胚胎学实验方法 (一) 花粉生活性的测定 [J]. *植物学通报*, 1993, 10(2): 60-62.
- [11] 吴志勇, 闫 静, 施维新, 等. “3414”肥料效应试验的设计与统计分析 [J]. *新疆农业科学*, 2008, 45(1): 135-141.
- [12] 韩 怡, 巢建国, 谷 巍, 等. 太子参花粉活性和柱头可授性研究 [J]. *种子*, 2012, 31(9): 37-40.
- [13] 许婉娜, 郑燕文, 李洁琼, 等. 不同化学因子对佛手柑花粉活性的影响 [J]. *贵州农业科学*, 2009, 37(7): 48-50.
- [14] 傅鸿妃. 植物花粉超低温保存研究进展 [J]. *长江蔬菜*, 2007(9): 40-42.
- [15] 傅立国, 陈潭清, 郎楷永, 等. 中国高等植物 (第 8 卷) [M]. 青岛: 青岛出版社, 1998.
- [16] 刘炳仑. 中国芸香科植物的花粉形态 [J]. *植物研究*, 1987, 7(3): 11-56.