

白花除虫菊同源四倍体株系 花期除虫菊酯含量及农艺性状分析

张晓霞, 高山林^①, 高艳丽, 邵春月, 焦小珂

(中国药科大学, 江苏 南京 210038)

摘要: 采用高效液相色谱法测定了16个白花除虫菊 [*Pyrethrum cinerariifolium* (Trev.) Vis.] 同源四倍体株系干花中的总除虫菊酯、总除虫菊酯 I (Py I) 和总除虫菊酯 II (Py II) 含量, 并分析了16个同源四倍体株系花中总除虫菊酯含量的动态变化规律以及花期的农艺性状。结果表明, 管状花开放初期, 同源四倍体株系干花中的除虫菊酯含量最高, 其中11个株系的总除虫菊酯含量高于二倍体株系且7个株系干花中的总除虫菊酯含量高于1.4%, 达到一级花的质量标准。同源四倍体株系的花茎和花序的农艺性状表现出明显的多倍体性状, 花茎低, 花盘直径大, 干花产量高, 通过合理密植可以提高同源四倍体株系的干花产量。

关键词: 白花除虫菊; 同源四倍体; 除虫菊酯; 含量; 农艺性状

中图分类号: Q946.8; S567.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-0978(2008)03-0067-06

Analyses on pyrethrins content and agronomic traits of autotetraploid lines of *Pyrethrum cinerariifolium* in flowering stage ZHANG Xiao-xia, GAO Shan-lin^①, GAO Yan-li, SHAO Chun-yue, JIAO Xiao-ke (China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2008, 17(3): 67-72

Abstract: The contents of pyrethrins, pyrethrins I and pyrethrins II in dry capitula of sixteen autotetraploid lines of *Pyrethrum cinerariifolium* (Trev.) Vis. were determined by RP-HPLC method, and the dynamic changing law of pyrethrins content and agronomic traits of autotetraploid lines were also analyzed. The results showed that the pyrethrins content in dry capitula of autotetraploid lines reached the highest at initial flowering stage of tubular florets, in which the pyrethrins content in dry capitula of eleven autotetraploid lines was higher than that of diploid line. The pyrethrins content in seven autotetraploid lines was higher than 1.4%, and reached the criterion of first-class capitula. The bolting stem and inflorescences of autotetraploid lines obviously appeared agronomic traits of polyploid, for example, short bolting stem, large floral disc diameter and high yield of dry capitula. The yield of dry capitula of autotetraploid lines of *P. cinerariifolium* will be increased by the reasonable close planting.

Key words: *Pyrethrum cinerariifolium* (Trev.) Vis.; autotetraploid; pyrethrins; content; agronomic trait

白花除虫菊 [*Pyrethrum cinerariifolium* (Trev.) Vis.] 为菊科 (Compositae) 小黄菊属 (*Pyrethrum* Zinn.) 多年生宿根草本植物, 以花或全草入药^[1]。其主要有效成分集中在花中, 提取的总除虫菊酯 (Py's) 含有6种有效杀虫成分, 其中 cinerin I、pyrethrin I 和 jasmolin I 为总除虫菊酯 I (Py I), cinerin II、pyrethrin II 和 jasmolin II 为总除虫菊酯 II (Py II)。总除虫菊酯是迄今发现的对环境无污染、对哺乳动物及植物无毒害作用、能迅速击倒昆虫和蚊蝇等、并且不易产生抗药性的高效天然杀虫

剂^[2]。目前, 已建立了多种针对除虫菊酯提取物的分析方法, 但应用高效液相色谱法测定除虫菊酯含量的研究却未见报道。

植物多倍化可使不同株系的产量和有效成分含量发生改变^[3], 为优良株系的形成创造了条件。鉴于此, 作者对初步筛选的白花除虫菊二倍体株系及

收稿日期: 2007-12-12

作者简介: 张晓霞 (1981—), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生, 主要从事中药生物技术研究。

^① 通讯作者 E-mail: shlingao@163.com

16个同源四倍体株系^[4]的花期进行了农艺性状测定,并采用RP-HPLC(C_{18})法测定了除虫菊酯的含量和产量,分析了同源四倍体株系干花中总除虫菊酯含量的动态变化规律,确定了白花除虫菊同源四倍体株系的最佳采摘期,并对最佳采摘期时各株系的除虫菊酯产量进行了比较,初步筛选出有效成分含量较高且药材干花产量高的白花除虫菊同源四倍体株系,以期为白花除虫菊优良株系的选育奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的白花除虫菊 [*Pyrethrum cinerariifolium* (Trev.) Vis.] 二倍体和同源四倍体株系均种植于中国药科大学实验苗圃。通过秋水仙素诱导并初步优选得到的16个同源四倍体株系为C-5、C-6、C-8、C-10、C-11、C-13、TB-1、6-3、6-11、6-12、5-4、5-6、5-1、H-6、H-15和H-9,以二倍体植株作为对照(CK)。供试的试管苗均于当年5月移栽至苗床,并于9月移栽至大田,次年4月至5月进入花期。

实验用Agilent 1100 LC型高效液相色谱仪为美国Agilent公司产品,包括1100泵、柱温箱、紫外检测器和Agilent化学工作站。试剂主要有乙腈(色谱纯,美国Tedia公司生产)、甲醇(特级纯,江苏汉邦科技有限公司生产)、纯净水(广州乐百氏食品饮料公司生产),其他试剂均为分析纯。除虫菊标准提取物由中国科学院昆明植物研究所提供,总除虫菊酯含量为54.78%,其中总除虫菊酯I(Py I)含量为35.66%、总除虫菊酯II(Py II)含量为19.12%,此标准提取物含量用AOAC官方分析方法936.05分析得出。

1.2 方法

1.2.1 除虫菊酯的提取和分析方法

1.2.1.1 标准曲线的绘制方法 精密移取除虫菊标准提取物10 μL (质量为9.240 mg),用甲醇溶解并定容至1.00 mL,混匀后精密吸取0.50 mL,用甲醇再次定容至2.00 mL,即得浓度为1.265 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的总除虫菊酯标准溶液。分别精密吸取按上述方法配制的总除虫菊酯标准溶液0.750 0、0.500 0、0.250 0、0.125 0、0.062 5和0.015 0 mL,用甲醇定

容至1.00 mL,即得浓度分别为1.265、0.949、0.633、0.316、0.158、0.079和0.019 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的总除虫菊酯标准品系列稀释溶液。精密吸取以上标准品稀释溶液各20 μL ,按下列色谱条件进行高效液相色谱分析并绘制标准曲线。

色谱条件:实验用色谱柱为Hypersil ODS2(C_{18})(4.6 mm \times 150 mm, 5 μm)。流动相为乙腈和水的混合溶液。采用梯度洗脱法,洗脱程序为:0~15 min,体积分数48%乙腈;15~30 min,体积分数58%乙腈;30~65 min,体积分数63%乙腈。柱温40 $^{\circ}\text{C}$,流速0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长240 nm^[5],进样量20 μL ,分析时间为65 min。

1.2.1.2 样品的提取和分析方法 在孕蕾盛期(花蕾呈扁圆形,为多层绿色苞片所包围)、舌状花开放期(舌状花直立)、管状花始开期(第1轮管状花开放)、管状花开放初期(舌状花平展,3轮管状花开放)、管状花开放盛期(舌状花平展,1/2的管状花开放)、开花末期(管状花全部开放)、子房充实期(管状花留存,部分萎蔫呈棕色)及瘦果成熟期(管状花枯萎脱落,子房由绿转黄)等8个时期^[6]分别采集白花除虫菊二倍体及16个同源四倍体株系的头状花序,干燥并粉碎后,精密称取干燥粉末0.1 g,置于具塞锥形瓶中,加入20 mL甲醇,于75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中冷凝回流15 min,冷却后过滤,滤液用0.45 μm 微孔滤膜再次过滤,所得滤液即为样品提取液。取20 μL 样品提取液,按标准曲线的高效液相色谱条件进行RP-HPLC分析。

1.2.1.3 方法学考察 精密度考察:取管状花开放初期的白花除虫菊二倍体花序样品提取液,连续进样6次,按上述色谱条件进行高效液相色谱分析,计算RSD。

稳定性实验:取管状花开放初期的白花除虫菊二倍体花序样品提取液,在避光条件下分别于配制后0、4、8、12、16、20和24 h按上述色谱条件进行高效液相色谱分析,计算RSD。

重复性考察:精密称取管状花开放初期的白花除虫菊二倍体干花粉末0.1 g,平行提取6次,分别进样,按上述色谱条件进行高效液相色谱分析,计算RSD。

回收率考察:精密称取已知除虫菊酯含量的管状花开放初期二倍体干花粉末各0.05 g,置于具塞锥形瓶中,加入总除虫菊酯标准溶液30 μL (1.265

$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 平行设置6份样品, 精密加入甲醇20 mL, 按上述样品提取方法制备样品溶液, 分别进样, 按上述色谱条件进行高效液相色谱分析, 计算RSD。

1.2.2 花期农艺性状的测定方法

1.2.2.1 花茎农艺性状的测定方法 采取定株观测的方法对白花除虫菊二倍体和16个同源四倍体株系进行花茎农艺性状观测。于4月至5月白花除虫菊的盛蕾期测定花茎高度(从花茎基部至顶端花蕾的总长度)、花茎直径(花茎最低花头分枝处的茎直径)、单株花茎数、每个花茎的花蕾数; 单株面积按下列公式计算得出: $\text{单株面积} = 1/4\pi \times d^2$, 式中 d 为单株冠幅直径。每一株系各选取10个单株进行测定。

1.2.2.2 花序农艺性状的分析 在管状花开放初期, 采取随机取样法测定白花除虫菊二倍体和16个同源四倍体株系50个单株的花序直径、单花序的鲜质量和干质量。

1.3 数据处理

采用Excel软件作图。以总除虫菊酯标准溶液峰面积(6个峰面积之和)为纵坐标, 以总除虫菊酯含量(μg)为横坐标进行回归分析, 得到总除虫菊酯标准曲线方程; 以Py I标准溶液峰面积(cinerin I、pyrethrin I和jasmolin I 3个峰面积之和)为纵坐标, 以标准溶液中Py I含量(μg)为横坐标进行回归分析, 得到Py I标准曲线方程; 以Py II标准溶液峰面积(cinerin II、pyrethrin II和jasmolin II 3个峰面积之和)为纵坐标, 以标准溶液中Py II含量(μg)为横坐标进行回归分析, 得到Py II标准曲线方程。按照样品色谱峰面积与各标准溶液相应峰面积的比例计算样品中各成分的含量。

计算各农艺性状指标的平均值和标准偏差, 并用Duncan检验法进行差异显著性检验($P=0.05$)。

2 结果和分析

2.1 除虫菊酯RP-HPLC测定的方法学考察结果

按照上述标准曲线的绘制方法, 得到了总除虫菊酯(Py's)、总除虫菊酯I(Py I)和总除虫菊酯II(Py II)的回归方程。总除虫菊酯标准溶液的回归方程为: $y = 106\ 065x + 991.79$, $R^2 = 0.999\ 9$, 线性范围为0.380~25.308 μg ; 总除虫菊酯I的回归方程

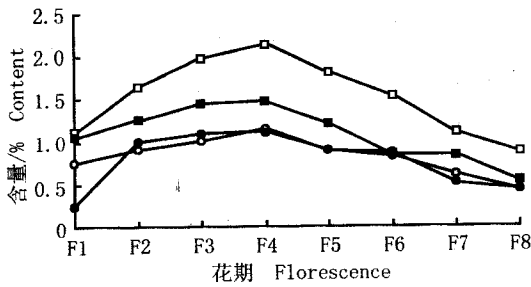
为: $y = 4\ 318.3x + 348.05$, $R^2 = 0.999\ 9$, 线性范围为0.247~16.475 μg ; 总除虫菊酯II的回归方程为: $y = 7\ 140.5x + 644.33$, $R^2 = 0.999\ 3$, 线性范围为0.133~8.833 μg 。

精密度实验中, 总除虫菊酯的平均峰面积为4584.6, RSD为0.45%; Py I的平均峰面积为2732.3, RSD为0.72%; Py II的平均峰面积为1852.3, RSD为0.29%。稳定性实验中, 总除虫菊酯的平均峰面积为4621.1, RSD为0.30%; Py I的平均峰面积为2774.0, RSD为0.32%; Py II的平均峰面积为1847.1, RSD为0.24%。重复性实验中, 总除虫菊酯的平均含量为0.738%, RSD为1.46%; Py I的平均含量为0.577%, RSD为1.79%; Py II的平均含量为0.161%, RSD为1.69%。回收率实验中, 平均回收率达到99.83%, RSD为1.90%。上述方法学考察结果表明, 采用RP-HPLC法测定白花除虫菊干花提取物中总除虫菊酯、Py I和Py II的含量, 实验的精密度较高、重复性良好, 加样回收率符合方法学考察的要求。

稳定性实验结果表明, 在避光条件下供试的样品溶液在24 h内基本保持稳定。总除虫菊酯的进样量为0.380~25.308 μg 、Py I的进样量为0.247~16.475 μg 、Py II的进样量为0.133~8.833 μg , 在进样量范围内线性关系良好。经预实验证明, 本实验中样品溶液的总除虫菊酯、Py I和Py II浓度均在线性范围内。

2.2 白花除虫菊花期总除虫菊酯含量的动态变化规律

以白花除虫菊二倍体(CK)及同源四倍体株系C-5、C-13和TB-1为研究对象, 分析了白花除虫菊花期不同阶段的总除虫菊酯含量及其变化规律, 结果见图1。由图1可以看出, 白花除虫菊干花中的总除虫菊酯含量在花期前期一直呈上升趋势, 并于管状花开放初期达到最大值, 此后, 总除虫菊酯含量开始急剧下降。由于90%以上的除虫菊酯都集中在白花除虫菊头状花序小花子房壁导管的油腺中, 因而小花子房壁导管油腺的发育状态与总除虫菊酯含量的变化直接相关, 除虫菊酯随着子房壁上油腺的发生、发展和分泌物转化而产生、积累和分解。研究发现, 白花除虫菊的小花子房快速生长期(孕蕾盛期至管状花开放初期)也正是油腺中除虫菊酯的快速生成时期。子房发育到一定阶段, 开



—●— 二倍体 Diploid (CK); —○— 同源四倍体株系 C-13 Autotetraploid line C-13; —■— 同源四倍体株系 C-15 Autotetraploid line C-15; —□— 同源四倍体株系 TB-1 Autotetraploid line TB-1.

F1: 孕蕾盛期 Bud stage; F2: 舌状花开放期 Flowering stage of ligulate flowers; F3: 管状花始开期 First flowering stage of tubular florets; F4: 管状花开放初期 Initial flowering stage of tubular florets; F5: 管状花开放盛期 Full flowering stage of tubular florets; F6: 开花末期 Later flowering stage; F7: 子房充实期 Ovary filling mature stage; F8: 瘦果成熟期 Achene mature stage. C-5, C-13: 用 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 12 h 诱导获得的同源四倍体株系 Autotetraploid lines induced by $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine for 12 h; TB-1: 用 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 24 h 诱导获得的同源四倍体株系 Autotetraploid line induced by $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine for 24 h.

图 1 白花除虫菊花期不同阶段干花中总除虫菊酯含量的变化
Fig. 1 Changes of pyrethrins content in dry capitula of *Pyrethrum cinerariifolium* (Trev.) Vis. in different flowering stages

表 1 孕蕾盛期白花除虫菊二倍体 (CK) 和同源四倍体株系的花茎田间农艺性状比较¹⁾
Table 1 Comparison of agronomic traits of bolting stem of autotetraploid lines and diploid plants (CK) of *Pyrethrum cinerariifolium* (Trev.) Vis. at bud stage¹⁾

株系 ²⁾ Line ²⁾	花茎高度/cm Height of bolting stem	花茎直径/mm Diameter of bolting stem	单株花茎数 Number of bolting stem per plant	每个花茎的花蕾数 Bud number per bolting stem	单株面积/m ² Area per plant	花头产量/千朵·hm ⁻² Yield of flower
CK	62.20 ± 2.90a	3.40 ± 0.11h	90.0 ± 6.72a	3.10 ± 0.57g	0.252 3	49.17
C-5	49.70 ± 2.79e	4.45 ± 0.13c	19.30 ± 2.45j	3.30 ± 0.82e	0.062 5	45.31
C-6	59.50 ± 2.07b	4.19 ± 0.12d	82.60 ± 5.83b	3.90 ± 0.57b	0.250 0	57.30
C-8	54.50 ± 1.78cd	5.58 ± 0.10a	20.60 ± 2.22j	3.00 ± 0.00h	0.062 5	43.97
C-10	43.40 ± 1.71f	2.75 ± 0.32j	20.50 ± 2.92j	3.10 ± 0.32gh	0.062 5	45.21
C-11	52.15 ± 2.68d	3.61 ± 0.23g	20.00 ± 2.65j	3.00 ± 0.23h	0.057 6	46.32
C-13	47.60 ± 1.96e	3.97 ± 0.26e	21.40 ± 3.31ij	4.00 ± 0.00b	0.062 5	60.90
TB-1	56.45 ± 2.56c	3.98 ± 0.18e	59.70 ± 3.34c	3.70 ± 0.06c	0.136 2	72.12
6-3	58.40 ± 1.75b	3.64 ± 0.09g	34.20 ± 3.12fg	2.60 ± 0.52i	0.084 1	47.02
6-11	58.50 ± 2.51b	3.80 ± 0.13f	31.00 ± 2.62gh	3.30 ± 0.67e	0.084 1	54.09
6-12	58.50 ± 2.42b	4.68 ± 0.18b	35.80 ± 2.82f	4.00 ± 0.47b	0.122 5	51.98
5-4	42.10 ± 2.60f	3.86 ± 0.10ef	24.30 ± 2.54i	4.40 ± 0.84a	0.072 9	65.22
5-6	59.70 ± 4.03b	4.20 ± 0.09d	41.70 ± 3.50e	3.20 ± 0.42f	0.122 5	48.44
5-1	55.30 ± 1.49c	4.27 ± 0.11d	29.10 ± 2.77h	3.90 ± 0.57b	0.090 0	56.07
H-6	52.90 ± 1.66d	3.38 ± 0.29h	11.20 ± 2.30k	3.00 ± 0.47h	0.025 6	58.36
H-15	52.25 ± 3.24d	3.14 ± 0.21i	32.30 ± 3.09g	3.10 ± 0.88g	0.090 0	49.47
H-9	49.85 ± 1.72e	3.92 ± 0.07f	56.30 ± 4.26d	3.40 ± 0.35d	0.156 3	54.46

¹⁾ 同列中的相同字母表示 Duncan 检验在 $P=0.05$ 水平上差异不显著 The same letters in the same column indicate no significant difference at $P=0.05$ level by Duncan's test. ²⁾ CK: 二倍体株系 Diploid line; C-5, C-6, C-8, C-10, C-11, C-13: 用 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 12 h 诱导获得的同源四倍体株系 Autotetraploid lines induced by $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine for 12 h; TB-1: 用 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 24 h 诱导获得的同源四倍体株系 Autotetraploid line induced by $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine for 24 h; 6-3, 6-11, 6-12: 用 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 36 h 诱导获得的同源四倍体株系 Autotetraploid lines induced by $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine for 36 h; 5-4, 5-6, 5-1: 用 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 12 h 诱导获得的同源四倍体株系 Autotetraploid lines induced by $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine for 12 h; H-6, H-15, H-9: 用 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 24 h 诱导获得的同源四倍体株系 Autotetraploid lines induced by $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine for 24 h.

始进入结实期(管状花开放初期至瘦果成熟期),此时,油腺中的除虫菊酯开始分解,除虫菊酯含量急剧下降。故白花除虫菊管状花开放初期为除虫菊酯的最高含量期,也是白花除虫菊花序的最佳采收期。

2.3 白花除虫菊花期农艺性状分析

2.3.1 花茎的农艺性状 白花除虫菊孕蕾盛期的花茎高度、花茎直径、单株花茎数、每个花茎的花蕾数、单株面积及花头产量见表 1。由表 1 可看出,白花除虫菊同源四倍体株系花茎的高度显著低于二倍体(CK),16 个同源四倍体株系中有 12 个株系的花茎直径大于二倍体,这些性状均有利于植株抗倒伏,使白花除虫菊对环境的适应性增强。16 个白花除虫菊同源四倍体株系的单株花蕾数均低于二倍体,但同源四倍体株系株型紧凑、单株面积小于二倍体,通过合理密植,16 个同源四倍体株系中有 12 个株系的花头产量高于二倍体,其中株系 TB-1 最高,为二倍体的 1.88 倍。

2.3.2 花序的农艺性状 管状花开放初期,白花除虫菊二倍体(CK)和同源四倍体株系的花序盘直径、

花序鲜质量、花序干质量及理论干花产量见表2。由表2可以看出,在16个同源四倍体株系中,有12个株系的花序盘直径明显大于二倍体(CK),最大的是二倍体的1.61倍。C-5、C-8、C-13、TB-1、6-3、6-11、6-12、5-4、5-6、5-1和H-9等11个株系干花序的花朵大小均匀,花序盘直径大于1.5 cm,干花色泽黄白色,成熟度合适,符合收购分级中一级花的标准(厂方要求),在品质上充分体现了同源四倍体的优势。

由表2还可以看出,在16个同源四倍体株系中,有5个株系的单花序干质量是对照的2.50倍以上。以干花的平均干质量乘以每公顷理论产花头数,得到了白花除虫菊每公顷的干花产量。同源四倍体株系中C-5、C-8、C-13、TB-1、6-3、6-11、6-12、5-4、5-6和5-1等10个株系通过合理密植,每公顷的干花产量可达到对照的2.00倍以上,体现了同源四倍体株系较强的增产潜力。

2.4 白花除虫菊优良同源四倍体株系的初步筛选和评价

管状花开放初期,16个白花除虫菊同源四倍体

株系的干花中除虫菊酯含量的测定结果见表3。由表3可见,16个同源四倍体株系中有8个株系的除虫菊酯含量显著高于二倍体(CK),最高的达到了二倍体的1.91倍。16个同源四倍体株系中有7个株系(C-5、C-8、C-10、C-11、TB-1、5-6和H-9)干花中的总除虫菊酯含量高于1.4%,达到一级花的质量标准。

通常情况下,典型的商业除虫菊花提取物中Py I和Py II的含量相当^[7]。供试的16个白花除虫菊同源四倍体株系中,有4个株系(C-10、C-11、TB-1和H-9)花序中的除虫菊酯含量不仅明显高于二倍体,而且Py I的含量与Py II的含量相当,符合典型的商业除虫菊提取物中两类除虫菊酯的含量比率。

白花除虫菊最主要的评价指标为总除虫菊酯的产量,根据表3中的数据可见,16个同源四倍体株系的除虫菊酯产量均高于二倍体(CK),表现出较好的增产效果。其中,同源四倍体株系TB-1的除虫菊酯产量最高,为二倍体株系的6.24倍。

表2 管状花开放初期白花除虫菊二倍体(CK)和同源四倍体株系的花序农艺性状比较¹⁾

Table 2 Comparison of agronomic traits of inflorescences of autotetraploid lines and diploid plants of *Pyrethrum cinerariifolium* (Trev.) Vis. at initial flowering stage of tubular florets¹⁾

株系 ²⁾ Line ²⁾	花序盘直径/cm Diameter of floral disc	单花序的鲜质量/g Fresh weight per flower	单花序的干质量/g Dry weight per flower	干花产量/kg·hm ⁻² Yield of dry flower
CK	1.22 ± 0.07g	0.58 ± 0.06g	0.13 ± 0.01i	6.39
C-5	1.96 ± 0.13a	1.44 ± 0.24c	0.30 ± 0.05e	13.59
C-6	1.36 ± 0.03f	0.91 ± 0.15e	0.18 ± 0.04g	10.31
C-8	1.93 ± 0.09a	1.94 ± 0.23a	0.36 ± 0.03ab	15.83
C-10	1.16 ± 0.05gh	0.77 ± 0.06f	0.16 ± 0.01gh	7.23
C-11	1.17 ± 0.03gh	0.66 ± 0.68fg	0.15 ± 0.01hi	6.95
C-13	1.62 ± 0.06de	1.27 ± 0.14d	0.22 ± 0.02f	13.40
TB-1	1.73 ± 0.04b	1.43 ± 0.32c	0.29 ± 0.04de	20.91
6-3	1.70 ± 0.04bc	1.65 ± 0.08b	0.30 ± 0.01de	14.10
6-11	1.63 ± 0.05cd	1.62 ± 0.06b	0.33 ± 0.02bc	17.85
6-12	1.61 ± 0.04de	1.84 ± 0.13a	0.36 ± 0.02ab	18.71
5-4	1.54 ± 0.06e	1.59 ± 0.07b	0.28 ± 0.02e	18.26
5-6	1.72 ± 0.06b	1.60 ± 0.05b	0.33 ± 0.03cd	15.98
5-1	1.75 ± 0.06b	1.85 ± 0.06a	0.37 ± 0.02a	20.75
H-6	1.14 ± 0.20h	0.71 ± 0.10fg	0.15 ± 0.01hi	8.75
H-15	1.20 ± 0.09gh	0.75 ± 0.10f	0.14 ± 0.06hi	6.93
H-9	1.66 ± 0.07c	1.14 ± 0.25de	0.21 ± 0.02f	11.44

¹⁾ 同列中的相同字母表示 Duncan 检验在 $P=0.05$ 水平上差异不显著 The same letters in the same column indicate no significant difference at $P=0.05$ level by Duncan's test. ²⁾ CK: 二倍体株系 Diploid line; C-5, C-6, C-8, C-10, C-11, C-13: 用 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 12 h 诱导获得的同源四倍体株系 Autotetraploid lines induced by $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine for 12 h; TB-1: 用 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 24 h 诱导获得的同源四倍体株系 Autotetraploid line induced by $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine for 24 h; 6-3, 6-11, 6-12: 用 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 36 h 诱导获得的同源四倍体株系 Autotetraploid lines induced by $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine for 36 h; 5-4, 5-6, 5-1: 用 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 12 h 诱导获得的同源四倍体株系 Autotetraploid lines induced by $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine for 12 h; H-6, H-15, H-9: 用 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 24 h 诱导获得的同源四倍体株系 Autotetraploid lines induced by $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine for 24 h.

表3 管状花开放初期白花除虫菊二倍体和同源四倍体株系除虫菊酯的含量和产量比较

Table 3 Comparison of contents and yields of pyrethrins in autotetraploid lines and diploid plants of *Pyrethrum cinerariaefolium* (Trev.) Vis. at initial flowering stage of tubular florets

株系 ¹⁾ Line ¹⁾	含量/% Content			除虫菊酯 产量/kg·hm ⁻² Yield of pyrethrins
	总除虫菊酯 I Py I	总除虫菊酯 II Py II	总除虫菊酯 Py's	
CK	0.747	0.380	1.126	0.072
C-5	0.593	0.880	1.473	0.200
C-6	0.966	0.237	1.203	0.124
C-8	0.791	0.718	1.509	0.239
C-10	0.848	0.884	1.732	0.125
C-11	0.894	0.815	1.709	0.119
C-13	0.790	0.381	1.171	0.157
TB-1	1.040	1.108	2.148	0.449
6-3	0.482	0.329	0.811	0.115
6-11	0.580	0.262	0.842	0.150
6-12	0.554	0.204	0.758	0.142
5-4	0.836	0.422	1.258	0.230
5-6	1.263	0.503	1.766	0.282
5-1	0.498	0.328	0.826	0.171
H-6	0.157	1.001	1.158	0.101
H-15	0.790	0.323	1.113	0.077
H-9	0.985	1.136	2.121	0.243

¹⁾ CK: 二倍体株系 Diploid line; C-5, C-6, C-8, C-10, C-11, C-13: 用 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 12 h 诱导获得的同源四倍体株系 Autotetraploid lines induced by $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine for 12 h; TB-1: 用 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 24 h 诱导获得的同源四倍体株系 Autotetraploid line induced by $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine for 24 h; 6-3, 6-11, 6-12: 用 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 36 h 诱导获得的同源四倍体株系 Autotetraploid lines induced by $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine for 36 h; 5-4, 5-6, 5-1: 用 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 12 h 诱导获得的同源四倍体株系 Autotetraploid lines induced by $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine for 12 h; H-6, H-15, H-9: 用 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理 24 h 诱导获得的同源四倍体株系 Autotetraploid lines induced by $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine for 24 h.

3 讨 论

由于目前尚没有针对除虫菊提取物或其单个菊酯成分的可靠性分析标准,因此,本研究设定由中国科学院昆明植物研究所提供的除虫菊标准提取物的总除虫菊酯(Py's)、总除虫菊酯 I(Py I)和总除虫菊酯 II(Py II)的含量为其真实含量(此标准提取物含量用 AOAC 官方分析方法 936.05 分析得到),并根据此标准提取物对样品进行定量分析。

用 RP-HPLC(C₁₈)法测定除虫菊酯简便可靠,且梯度洗脱比较有利于分离总除虫菊酯中的 6 种菊酯成分。在本实验设置的分离条件下,分离度较高,

基线平稳,没有杂质峰出现,重复性好。该方法的建立对白花除虫菊的品种选育和质量控制等研究具有十分重要的意义,可为白花除虫菊优良品种选育过程中化学含量方面的考察提供方法学依据和简便易行的分析手段,为白花除虫菊的育种工作和品质评价奠定了化学分析的基础。

目前,生物技术已广泛应用于药用植物优良品种的选育工作中,组织培养条件下的多倍体育种更是一种简便、成熟且行之有效的育种方法,可获得产量高、有效化学成分含量高且抗逆性好的优良药材品种。本实验所用的 16 个同源四倍体株系就是本实验室研究人员以白花除虫菊为材料、经化学诱导和鉴定并经过多项指标测定筛选出的优良同源四倍体株系,RP-HPLC(C₁₈)分析测定结果表明,白花除虫菊同源四倍体株系的总除虫菊酯含量显著高于二倍体植株。

白花除虫菊的主要经济性状和评价指标是单花序的干质量、干花产量、花盘直径、花中除虫菊酯含量和总除虫菊酯的产量。虽然白花除虫菊同源四倍体株系的花体积增大、花数量有所减少,但由于同源四倍体株系大多株型紧凑、单株面积小,因此,可通过合理密植获得较好的增产效果。对这些同源四倍体株系进行进一步的选育和试验,可为最终培育出高产优质的白花除虫菊新品种奠定基础。

参考文献:

- [1] 杜冰群,刘启宏,朱翠英. 除虫菊的染色体数目及其核型[J]. 武汉植物学研究, 1988, 6(1): 95.
- [2] 王耀生,闫秀琴. 天然除虫菊的研究与应用[J]. 植物医生, 2004, 4(1): 104.
- [3] Wendel J F. Genome evolution in polyploids[J]. Plant Mol Biol, 2000, 42: 225-249.
- [4] 刘 蓁. 白花除虫菊同源四倍体的诱导及鉴定[J]. 药物生物技术, 2006, 13(3): 178-181.
- [5] Wang I H, Subramanian V, Moorman R, et al. Direct determination of pyrethrins in pyrethrum extracts by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode-array detection [J]. J Chromatogr A, 1997, 766: 277-281.
- [6] 俞宏渊,曾令杰,陈宗莲. 除虫菊开花特性与适宜采摘期[J]. 云南植物研究, 2000, 22(2): 181-186.
- [7] Hitmi A, Barthomeuf C, Sallanon H. Rapid mass propagation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. by callus culture and ability to synthesis pyrethrins[J]. Plant Cell Rep, 1999, 19: 156-160.