

Study on Pollen Viability and Stigma Receptivity of *Pinellia ternata*

Xuesi Jia¹, Xue Wang², Yuqing Wang¹

¹Shanxi Agricultural University, Jinzhong

²Yangquan Jinfeng planting Co. Ltd., Yangquan

Email: glsyxs@163.com

Received: Jun. 24th, 2013; revised: Jul. 8th, 2013; accepted: Jul. 20th, 2013

Copyright © 2013 Xuesi Jia et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: This paper studied on the pollen viability and stigma receptivity of *Pinellia ternata* for the first time, as to provide a scientific basis for sexual reproduction and breeding of new varieties. In the three determination methods of *P. ternata* pollen activity, the staining effect of TTC was not ideal. The staining effect of MTT was best, which was beneficial to identify pollen viability, because it made pollen come out three kinds of color reaction of purple, faint red and colorless. Its dyeing rate was 86.59%. The staining effect of methylene blue was better, but the dyeing rate was higher than MTT, which was 89.62%. The opening time of *P. ternata*'s female flower was slightly earlier than male flower in a day. There were 48 - 72 h to make an appointment between pollen and stigma receptivity. Pollen scattering was concentrated on the third and fourth days of flower opening. During this period of time, the number of pollen was larger and the pollen activity was kept between 85.15% - 94.11%. The stigma receptivity was high during the former day, the very day and the second day of blooming. Artificially control pollination could improve the seeds setting percentage and seed number of *P. ternata*.

Keywords: *Pinellia ternata*; Pollen Viability; Stigma Receptivity

半夏花粉活性和柱头可授性测定研究

贾学思¹, 王雪², 王玉庆¹

¹山西农业大学, 晋中

²阳泉市锦丰种植有限公司, 阳泉

Email: glsyxs@163.com

收稿日期: 2013年6月24日; 修回日期: 2013年7月8日; 录用日期: 2013年7月20日

摘要: 本文首次对半夏的花粉活性和柱头可授性进行了研究, 以为半夏的有性繁殖和育种研究提供科学依据。在3种测定半夏花粉活力的方法中, TTC染色法的染色效果不理想; MTT染色法最优, 使花粉出现紫色、淡红色、无色三种颜色反应, 利于观察, 其染色率为86.59%; 次甲基蓝染色法的染色效果次之, 但染色率略高于TTC染色法, 为89.62%; 半夏雌花在一天中的开放时间略早于雄花, 其花粉活力与柱头可授性相遇时间为48~72h; 散粉集中于开花第3、4天, 此时花粉数较多, 花粉活力维持在85.15%~94.11%; 而于开花前一天、开花当天和开花第2天的柱头活性较强; 人工控制授粉可提高半夏的结实率和种子数量。

关键词: 半夏; 花粉活性; 柱头可授性

1. 引言

半夏(*Pinellia ternata*)为天南星科半夏属多年生草本植物,以块茎入药,为大宗常用紧销中药材,人工栽培历史较短。半夏在野生状态和栽培生产上,无性繁殖的数量远比有性繁殖多,多代无性繁殖造成半夏品种退化,病虫害严重,产量和品质明显降低,使种半夏的经济效益降低,使半夏栽培的推广受限。而半夏种子繁殖具有简便、经济、繁殖系数大的特点,其种源较大,利于发展生产。随着国家大力推进中药现代化,对中药材生产实施 GAP 管理,优良品种的选育应该作为一个首要课题来研究^[1]。目前,尚无对半夏花粉活性和柱头可授性研究的报道,通过对半夏花粉活性和柱头可授性的研究,为半夏的有性繁殖研究奠定基础。在植物有性繁殖过程中,雄蕊与雌蕊之间的传粉是基础,传粉过程始于花药开裂和成熟花粉的散出,携带着雄配子体或其前体的花粉粒被暴露在干燥条件下,必须在具有活力时到达适宜的接受柱头,才能完成授粉^[2]。花粉是种子植物的雄配子体,在有性繁殖中发挥着重要作用^[3]。因此,花粉活性与柱头可授性是人工辅助授粉成败的关键因素。近几年,花粉生活力与寿命及柱头的可授性研究已经引起不少学者的重视,并开展了大量的工作^[4-5]。通过对半夏不同开花天数的花粉活力、柱头可授性的测定研究,确定采集花粉和授粉的最佳时期,以期半夏的人工授粉、有性繁殖及育种研究提供理论依据。

2. 材料与方法

2.1. 材料采集与处理

材料取自山西农业大学药用植物种植园半夏。试验时间为2009年6月中旬(半夏盛花期),采集开花第1天、第2天、第3天、第4天、第5天、第6天的花各5朵,收集各不同开花天数的花粉,立即通过TTC(氯化三苯基四氮唑)、MTT(四甲基偶氮唑蓝)、亚甲基蓝分别染色、制片,在Olympus光学显微镜下观察、计数、照相。每种染色方法均观察3个制片,每个制片取5个视野,计数染色和未染色的花粉粒数,统计花粉染色率,以染色率表示花粉的活力百分率。有活力花粉的比例 = 染色花粉数/观察花粉总数 × 100%。

2.2. 试验方法

2.2.1. 花粉活力的测定

TTC 染色法:将花粉粒置于载玻片上,用浓度0.5% TTC 染液进行染色,在35℃的温箱中放置15~30 min后,置光学显微镜下观察。被染成红色(活力较强)和淡红色(活力较弱)的为有活力花粉,无色的则为无活力花粉。

亚甲基蓝染色法:将花粉放在载玻片上,加1滴0.1%亚甲基蓝溶液,用镊子搅拌均匀,然后盖片、镜下观察。凡被染成蓝色的花粉表示有生活力,没有着色或着色过浅者为丧失生活力的花粉。

MTT 染色法:称取0.1 g MTT,溶解于5 ml配制好的50 g/L蔗糖溶液中,摇匀置于冰箱中避光保存。取少量花粉置于载玻片上,加1~2滴MTT溶液,盖上盖玻片;将制片在室温条件下放置10 min,然后在光学显微镜下观察。凡被染成紫色的花粉,其生活力较强。淡红色次之,无色者为不具生活力的花粉或不育花粉。

2.2.2. 柱头可授性的测定

开花前去雄处理。分别采集开花前一天、开花当天、开花第2 d、开花第3 d、开花第4 d、开花第5 d各10朵花,将不同发育时期的新鲜柱头完全浸泡在上述配制好的MTT溶液中,在解剖镜下观察并计数,柱头周围染成紫红色,表明该柱头有活性;若无色或染色太浅者无活性。

3. 结果与分析

3.1. 花粉活力及数量测定结果

3.1.1. TTC 染色法测定结果

光学显微镜下,所观察的视野内花粉粒均为淡红色,染色不明显(见图1(a)),与对照蒸馏水处理的花粉差别甚微(见图1 CK),不能有效地观测花粉活性的有无。因此,该方法不适合检测半夏的花粉活力。

3.1.2. 次甲基蓝和 MTT 染色法测定结果

通过显微观测,发现半夏花粉粒呈浅橙黄色,圆球形,饱满。次甲基蓝染色法测得平均花粉活力为89.62%,略高于MTT染色法测得的结果:86.59%。这是由于次甲基蓝亦能使衰老和死亡的花粉着色,使

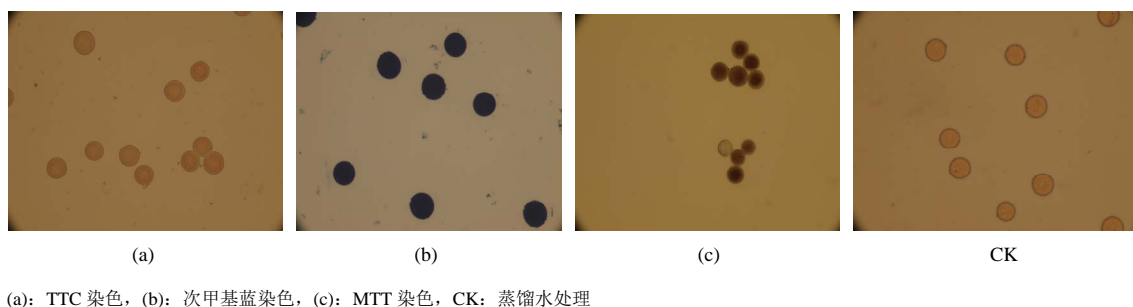


Figure 1. *P. ternata* pollen of different staining methods
图 1. 不同方法染色的花粉粒

得花粉活力的测定值偏高^[6]。MTT 染色法能将花粉染成紫色、浅红色和无色，染色效果较理想(见图 1)。

3.1.3. 不同开花天数对花粉活力和花粉数量的影响

开花第 1 天，半夏一般不散粉；开花第 2 天进入散粉初期，花粉活力最高，为 97.68%，但花粉数量很少，在显微镜下，每个视野的平均花粉粒数仅 21 粒；随着散粉的进行，花粉数量明显增加，但花粉活力逐渐减弱(图 2)；开花第 3、4 天，散粉进入盛期，花粉数量达到最大，每个视野的平均花粉粒数达 137 粒，花粉活力维持在 85.15%~94.11%，此期适宜进行花粉的采集。开花第 5、6 天，花粉主要粘附在佛焰苞上，花粉活力降低到 53.80% 以下，且花粉数量明显减少，散粉结束(表 1)。

3.2. 柱头可授性测定结果

将开花不同天数的花朵柱头浸入 MTT 染色液中，十分钟后，结果发现，开花前一天、开花当天和开花第 2 天的柱头均被染成紫红色，柱头活性 100%，柱头活性强；而开花第 3 天的柱头活性虽然为 100%，但染色较浅，说明柱头活性已降低；开花第 4 天和第 5 天的柱头经染色后，大部分柱头为无色，柱头活性平均仅 9.21%(表 2)，即一个雌花序中，有活性柱头仅 1~5 个。

4. 结论与讨论

在本试验采用的 3 种测定花粉活力的方法中，MTT 染色法最优，次甲基蓝染色法次之，TTC 染色法不适宜测定半夏的花粉活力。TTC 染色效果不明显的原因可能是半夏花粉粒的结构特殊或是试验条件不够适合，需进一步研究。而测定花粉活力的方法很

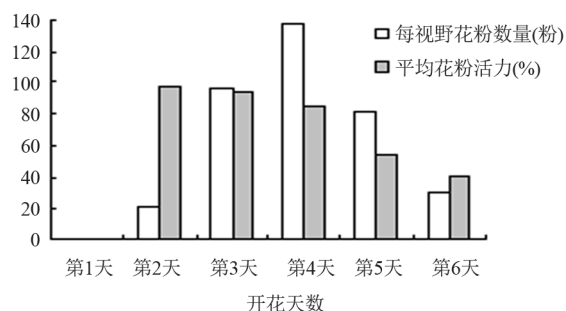


Figure 2. Pollen number and activity in different days of blooming
图 2. 不同开花天数的花粉活力和花粉数量

多，如 I_2 -KI 染色法、醋酸洋红染色法和荧光素二醋酸酯染色法^[7]等，是否有更适合测定半夏花粉活力的方法，还有待于进一步研究。

在半夏的生殖生长过程中，雌花在一天的开放时间略早于雄花，何亚平^[8]等人认为雌花先熟是一种保证异花授粉和促进基因交流的对策，具有进化意义。半夏于开花第 2~3 天开始散粉，第 4 天进入散粉盛期后，大约持续 25 h；而柱头于散粉前期已具有活性，开花后柱头活性可持续约 48 h，说明半夏雌花与雄花花期相遇，相遇时间为 48~72 h，在时间与空间上完成授粉的可能性是相当大的。但半夏的有性结实率较低，种子数量较少。王祖秀^[9]等人对半夏雄配子败育的原因进行了报道。其结果显示：半夏的减数分裂异常，减数分裂的各时期都存在遗传物质不均衡分离的异常结构，染色体结构变异是半夏雄配子败育的主要原因；成熟花粉粒中可育花粉不足 1%，三核期是其雄配子败育的时期。对于是否存在其它原因使得半夏的有性结实率降低，以及半夏的花粉萌发率、花粉管的生长状况还有待于进一步研究。

花粉生活力是花粉具有存活、生长、萌发或发育的能力，在常规育种中，尤其是在杂交育种工作中，

Table 1. Pollen number and activity in different days of blooming
表 1. 不同开花天数的花粉数量与花粉活力

| 开花天数(d) | 第 1 天 | 第 2 天 | 第 3 天 | 第 4 天 | 第 5 天 | 第 6 天 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 每视野花粉数量(粒) | 0 | 21 | 97 | 137 | 86 | 30 |
| 次甲基蓝花粉活力(%) | 0 | 98.22 | 95.46 | 88.32 | 56.97 | 43.63 |
| MTT 花粉活力(%) | 0 | 97.14 | 92.75 | 82.03 | 50.63 | 37.96 |
| 平均花粉活力(%) | 0 | 97.68 | 94.11 | 85.18 | 53.80 | 40.79 |

Table 2. Stigma activity in different days of blooming
表 2. 不同开花天数的柱头活性

| 开花天数(d) | 前 1 天 | 第 1 天 | 第 2 天 | 第 3 天 | 第 4 天 | 第 5 天 |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 柱头活性(%) | 100 | 100 | 100 | 100 | 15.63 | 2.78 |

常进行人工辅助授粉或杂交授粉, 研究花粉的生活力和育性是必不可少的基础性工作^[10]。柱头可授期是花朵成熟过程中的一个重要时期, 它能在很大程度上影响自花传粉率、开花不同阶段的传粉成功率、雄性和雌性功能之间的相互干扰等^[11]。花粉具有活力、同时柱头具有可授性是完成受精的必要条件。半夏于开花第 2~3 天, 花粉数量多, 花粉活力较强, 维持在 90% 以上, 适宜于采集花粉; 而雌蕊柱头于开花前一天、开花第 1 天和第 2 天可授性较高, 适宜进行授粉工作。通过人工控制授粉, 可提高半夏的结实率和种子数量。

参考文献 (References)

[1] 蔺海明, 主编. 中药材生产质量管理规范教程[M]. 中国农业

- 出版社, 2008: 94-95.
- [2] 红雨, 刘强, 韩岚. 芍药花粉活力和柱头可授性的研究[J]. 广西植物, 2003, 23(1): 90-92.
- [3] 牛东玲, 宋玉霞, 郭生虎等. 肉苁蓉花粉生活力测定研究[J]. 中草药, 2004, 35(6): 679-682.
- [4] 刘林德, 张萍, 张丽等. 锦带花花粉活力、柱头可授性及传粉者的观察[J]. 西北植物学报, 2004, 24(8): 1431-1434.
- [5] W. G. Yi, S. E. Law, D. McCoy, et al. Stigma development and receptivity in almond. *Annals of Botany*, 2006, 97(1): 57-63.
- [6] 张妍, 杨发君, 田义新. 穿龙薯蓣花粉活力及柱头可授性测定方法研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(5): 2344-2346.
- [7] 王定康, 孙桂芳, 郭志明等. 滇重楼的花粉活力测定方法比较[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(35): 11451-11453.
- [8] 何亚平, 费世民, 徐嘉等. 四川麻疯树花序结构和雌雄花动态研究[J]. 四川林业科技, 2008, 29(2): 1-7.
- [9] 王祖秀, 彭正松, 何奕昆. 半夏(*Pinellia ternata*)雄配子败育的遗传分析[J]. 作物学报, 2000, 26(1): 83-86.
- [10] 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): 4742-4745.
- [11] 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.