

# 果树花粉生活力检测研究进展

刘程宏, 宋尚伟\*, 张芳明  
(河南农业大学 园艺学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 果树花粉生活力检测的方法有染色法、萌发法、授粉结实检测法及其他一些方法, 常用的染色法有联苯胺染色法、TTC 染色法、I<sub>2</sub>-KI 染色法、FCR 染色法等, 萌发法又包括离体萌发法和活体萌发法。掌握花粉生活力检测方法对于提高杂交育种效率具有较高的实际应用价值, 为此, 对上述各种方法及其应用研究进展进行了综述, 并对各方法的检测效果进行了评价和比较。

**关键词:** 果树; 花粉; 生活力; 检测方法; 检测效果

**中图分类号:** S66      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2011)10-0013-04

## Progress on Test Methods of Pollen Viability in Fruit Trees

LIU Cheng hong, SONG Shang wei\*, ZHANG Fang ming  
(College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Testing the viability of fruit tree pollen contained dyeing, germination, pollination and some other methods. Dyeing method often includes diaminobiphenyl dyeing, TTC dyeing, I<sub>2</sub>-KI dyeing, FCR dyeing, etc. Germination method includes germination *in vitro* and germination *in vivo*. This paper summarized the various methods of testing fruit tree pollen viability and thier application, and compared the detection results of each method.

**Key words:** Fruit tree; Pollen; Viability; Test methods; Detection result

花粉是高等植物的雄配子体, 在育种上可用来解决不同果树品种开花期不遇和异地果树品种杂交困难问题。为了进行人工辅助授粉或杂交授粉, 需要早期采集和贮存花粉, 尤其是在杂交育种工作中, 研究花粉的生活力和育性是必不可少的基础性工作。在使用、采集和贮存花粉之前, 需要先对花粉生活力进行检测。花粉生活力是指花粉具有存活、生长、萌发或发育的能力<sup>[1]</sup>。其测定方法通常包括花粉染色测定法、花粉萌发测定法和花粉授粉结实检测法等。不同果树花粉的生活力检测方法又不尽相同, 为此, 就果树花粉生活力的检测方法进行综述, 以期为提高果树杂交育种效率提供依据。

### 1 花粉染色测定法

#### 1.1 联苯胺染色法

联苯胺染色法又称过氧化物酶染色法或沙尔达

考夫染色法, 是根据花粉中过氧化物酶的活性来判断花粉的生活力。该方法是目前应用较广的一种花粉染色方法。

刘大瑛等<sup>[2]</sup>采用沙尔达考夫染色法对 15 个国外李品种的花粉进行了生活力的检测, 结果表明, 黑宝石、澳得罗达、澳大利亚 14 号、美国大李有活力的花粉粒所占比例较低, 为 73.0%~79.4%, 黑宝石最低, 其余 11 个品种较高, 为 80.0%~87.7%, 红肉李最高。任列花等<sup>[3]</sup>在测定 15 个早实核桃品种花粉粒的性状、大小及生活力时也用了联苯胺染色法, 在测定的 15 个早实核桃品种中, 其花粉在采粉后第 3 天均表现出很强的生活力, 最强的品种是香玲和中林 1(接近 100%), 生活力最低的品种为辽 3(87%), 其余品种也均在 90%以上。朱立武等<sup>[4]</sup>采用过氧化物酶染色法对李 11 个品种类型的花粉生活力进行了检测, 结果表明, 李品种花粉活力普遍

收稿日期: 2011-06-20  
作者简介: 刘程宏(1987), 女, 河南鹤壁人, 在读硕士研究生, 研究方向: 果树生理及生物技术。

E-mail: Hong-pengpeng@yahoo.com.cn  
\*通讯作者: 宋尚伟(1965), 男, 河南滑县人, 副教授, 主要从事果树生理及生物技术研究。E-mail: songshw959@163.com  
©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

较低,一般不超过 40%。陈延惠等<sup>[5]</sup>在对采集的 6 个猕猴桃类型的雄株花粉进行生活力测定和贮藏性研究中用的也是沙尔达考夫法。刘会宁等<sup>[6]</sup>用该法对中油 4 号等 5 个桃品种的花粉进行了生活力测定,结果表明:所测花粉生活力高低顺序为:艳光>早红宝石>鄂桃 1 号>中油 4 号>早露蟠桃。廖康等<sup>[7]</sup>在对新疆野生樱桃李的花粉生活力进行检测时认为,测定花粉生活力最好使用花粉发芽法,若用染色法测定花粉活力,尽量选用与发芽法测定结果较为一致的过氧化物酶染色法。

### 1.2 TTC 染色法

TTC 即 2, 3, 5 氯代三苯基四氮唑,是一种氧化还原染料。TTC 染色法的基本原理是:当 TTC 渗入细胞后,可被呼吸代谢中的还原酶所还原,并由无色的氧化型变成红色的还原型,变红色的为有活力的,无色的为无活力的。这也是一种应用较广的花粉染色方法。

齐国辉等<sup>[8]</sup>用 TTC 染色法对香玲等 4 个核桃品种花粉的生活力进行了检测,比较得知,岱香和上宋花粉生活力极显著高于香玲,显著高于中林 1 号。李学强等<sup>[9]</sup>在研究不同贮藏条件及生长调节剂对欧李花粉生活力的影响时,用到了 TTC 染色法检测欧李的花粉生活力。杨瑞等<sup>[10]</sup>在不同发育阶段、不同干燥方式及不同贮藏条件对葡萄花粉生活力影响的研究中,采用 TTC 染色法对葡萄花粉的生活力进行测定,结果表明:葡萄始花期的花粉生活力明显高于开花前 2d;室内自然阴干是花粉的最佳干燥方式,且花粉贮藏以低温干燥法最好。江雨生等<sup>[11]</sup>用 TTC 法对经过超低温贮藏的桃、梨花粉进行生活力测定,发现离体萌发率和授粉结实率均接近新鲜花粉的水平,表明桃、梨花粉具有很强的耐冷性。这种长期保存法,将有助于桃、梨育种和种质资源的保存。香梨<sup>[12]</sup>、银杏<sup>[13]</sup>、樱桃李<sup>[7]</sup>等的花粉也都可用此法进行生活力检测。

Cohen 等<sup>[14]</sup>对番木瓜的花粉进行生活力检测,结果显示,TTS(氯化三苯基四氮唑盐)及 NBT(氮蓝四唑)的染色效果较好。

### 1.3 I<sub>2</sub>-KI 染色法

此法的基本原理是:根据淀粉遇碘变蓝的特性,据蓝色的深浅程度来判断花粉粒中淀粉的含量,从而确定花粉粒活性的高低。该方法在梨<sup>[15]</sup>、香梨<sup>[12]</sup>、柑橘<sup>[16]</sup>、银杏<sup>[13]</sup>、梅(桃)属<sup>[17]</sup>、樱桃李<sup>[7]</sup>、澳洲坚果<sup>[18]</sup>等植物上均有应用。

I<sub>2</sub>-KI 染色法原理简单,应用方便,但由于它是靠花粉粒内的淀粉着色而进行判定,所以虽然花粉

失去了活力,但是因为淀粉依然存在,还会测得活力,这就使得测定值偏高,而且对于那些淀粉含量少的种类该方法并不适宜<sup>[19]</sup>。

### 1.4 FCR 测定方法

FCR 测定方法也叫荧光染料反应法,其基本原理是荧光染料本身不产生荧光,无极性,并能自由地透过完整的原生质膜。当此种染料进入原生质后,即被酯酶作用形成一种能产生荧光的极性物质——荧光素。由于荧光素不能自由地出入原生质膜,而只在细胞内积累,因此可以根据花粉产生荧光的情况来判断花粉的生活力:经过荧光素双乙酸反应,活细胞发出绿色荧光,死细胞无荧光,可统计花粉细胞存活率(FCR 值)<sup>[20]</sup>,而且,该方法可同时反映出酶活性和质膜情况<sup>[21]</sup>。

张毅等<sup>[22]</sup>利用 FCR 方法对不同散粉期和不同贮藏条件下山核桃花粉生活力进行了测定。结果表明:在散粉周期中,花粉生活力变化平均值呈正态分布,散粉盛期花粉具最高生活力。不同贮藏条件对保持花粉生活力具有显著影响,随着贮藏时间的增长,花粉活力逐渐递减,室温贮藏条件下递减最快。尹增芳等<sup>[23]</sup>在研究鹅掌楸花粉保存条件时,采用了较简便的荧光染色法——FDA(荧光素二醋酸酯)法,其实质也是 FCR 方法。Reale 等<sup>[24]</sup>在研究橄榄的生殖生物学中也用到了 FDA 法。利用 FDA 法,在镜检时,花粉粒是否发荧光,二者区别十分明显,可消除如染色等由于染料引起的误差。FDA 法染色时间短,10min 后即可镜检,且不需制备培养基进行培养,测定过程简便快速,但是稳定性较差,需要重复测定,估计值偏高。

### 1.5 MTT 染色法

该方法是使用四唑盐类染料 MTT(2, 5 联苯四唑溴化物或噻唑蓝),根据花粉粒中脱氢酶的活性判断花粉生活力。若染色后,花粉呈深粉红色或表面有不规则的黑线,则证明花粉有生活力<sup>[25]</sup>。姜雪婷等<sup>[15]</sup>应用该方法测定了梨花粉的生活力,发现测定值明显偏高,不适宜梨花粉生活力的测定。该方法的缺点是与萌发测定不相关,染色后花粉的颜色差别很小,不易分辨,导致测定值偏高,所以应用很少。

### 1.6 醋酸洋红染色法

醋酸洋红染色法的原理是靠花粉中的脱氢辅酶而染色。林玉虹等<sup>[26]</sup>在澳洲坚果花粉活力与柱头可授性研究中,用该方法对花粉进行生活力检测,用 1%醋酸洋红染色液进行染色,在 37℃恒温箱内放置 2h 左右,然后用 10×10 生物显微镜镜检,凡是

染上红色的表明有活力, 无色的表明无活力<sup>[27]</sup>。王忠等<sup>[28]</sup>在研究植物生长调节剂对红葡萄花粉活力的影响中, 采用了醋酸洋红染色法对花粉活力进行鉴定。但是醋酸洋红染色法的缺点是, 当花粉失去活力时, 脱氢辅酶的活性仍然存在, 所以该方法的测定结果偏高<sup>[29-32]</sup>。

### 1.7 其他

其他染色方法如靛红染色法, 是根据花粉中脯氨酸的有无来判断花粉生活力, 所以对于细胞中脯氨酸含量少的种类则不适用<sup>[33]</sup>, 且染色界限不明显, 使得该法测定效果不佳。而甲基蓝、中性红等染色法是根据细胞质的有无来判断花粉生活力<sup>[34]</sup>, 与离体萌发测定有相关性, 但是能使死花粉着色, 导致测定值偏高。

## 2 花粉萌发测定法

花粉萌发率是衡量花粉生活力状况的主要标志, 同时花粉管长度亦在一定程度上反映花粉的生活力状况。花粉萌发测定又分为离体萌发和活体萌发 2 种。

### 2.1 离体萌发测定法

花粉离体萌发一般在培养基上进行, 常用的培养基基本成分是糖和硼。其体积分数一般为蔗糖 10%~20%, 硼酸 0.001%~0.005%, pH 值 5.8~6.5<sup>[35]</sup>。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<sup>[36]</sup>。另外, 葡萄糖也可以作为培养基成分, 因为葡萄糖是真正的小分子物质, 较蔗糖而言易被细胞吸收, 花粉萌发效果好。曹广力等<sup>[37]</sup>在研究外源性糖对 4 种木本观赏植物花粉离体培养的影响时发现, 葡萄糖对于桃的花粉萌发作用优于蔗糖。常用的培养基有固体和液体 2 种, 不同树种花粉的检测所用培养基不同, 且各试验中花粉萌发所需要的培养基不尽相同。例如同是检测李的花粉生活力, 张义等<sup>[38]</sup>采用的是每 100 mL 培养基含 1 g 琼脂和 10 g 蔗糖, 另添加硼酸、钼酸钠、赤霉素和萘乙酸等调节剂。宋立功等<sup>[39]</sup>确定的适宜培养基则是 5% 蔗糖+1% 琼脂+0.1% 硼酸。而刘大瑛等<sup>[2]</sup>采用的则是悬滴液发芽法。王世茹等<sup>[40]</sup>在测定桃花粉生活力时使用的是 10 g 蔗糖和 1 g 琼脂加 90 g 水配制而成的培养液。赵彩平等<sup>[41]</sup>使用的是 1% 琼脂+10% 蔗糖+0.01% 硼酸+0.03% 硝酸钙, pH 值 6.5 的固体培养基。刘会超等<sup>[42]</sup>采用萌发法对垂丝海棠的花粉生活力进行测定时, 筛选得到的垂丝海棠花粉萌发和花粉管生长的最佳培养基是: 0.8 g/L

琼脂+15 mg/L 蔗糖+2.0 mg/L 硼酸。

### 2.2 活体萌发测定法

活体萌发测定法的基本原理是具有花粉管的花粉粒能被锚定在柱头上, 并且不会被漂洗掉, 因此, 可以通过漂洗柱头和比较漂洗前后柱头上的花粉粒数目来推测其萌发率<sup>[43]</sup>。研究表明, 可以通过观测花柱内花粉管生长情况及花粉管是否能达到花柱基部的方法来确定品种的 S 基因型<sup>[44]</sup>。

活体萌发法测定花粉生活力, 与其他方法相比最为直接可靠, 因为它模拟了自然状态下的受精状况, 但仅适合于感受性柱头, 测定结果偏低, 柱头的表面性质对所测试样也有所限制, 到目前为止, 在果树花粉活力测定上尚鲜有报道。

## 3 花粉授粉结实检测法

该法是将新鲜花粉与经过贮藏后的花粉给果树植株授粉, 观测并比较花粉贮藏后授粉果树的结实率。此方法根据结实情况判断花粉生活力, 比较可靠和精确, 但费时费力, 且只能定性而不能定量。

## 4 其他

另外, 还有利用花粉形状来判断花粉生活力的形态测定法。刘大瑛等<sup>[2]</sup>在对 15 个国外李品种花粉生活力检测时就用到形态法, 结果其中 3 个品种花粉为长桶形, 其余品种均为长椭圆形, 花粉生活力黑宝石最低, 早香红最高。苗青等<sup>[34]</sup>对文冠果花粉进行了形态学观察, 发现败育花粉和可育花粉均为圆形表面有疣状突起, 但大小不同; 两者均有 3 个萌发沟, 萌发沟内有莲花状复饰物, 但败育花粉在萌发沟之间有压痕, 上下各 3 个, 对称分布。

各种染色法和形态测定法分别是根据染色反应和花粉形态来检验花粉生活力, 它们都是对花粉生活力的间接检测, 而不能直接表现花粉实际萌发率, 只有在这些检验方法得到的数据与萌发检验、授粉检验相一致或呈相关性的情况下, 才适合应用这些方法。所以, 在具体测定时可根据花粉种类、目标要求和现有条件选择合适的测定方法, 也可选几种方法同时进行。

### 参考文献:

- [1] Preston R E. The intrafloral phenology of streptanthus tortuosus (*Brassica caea*) [J]. Amer J Bot, 1991 (8): 1044-1053.
- [2] 刘大瑛, 徐发德, 李培菊. 15 个国外李品种花粉生活力的观察 [J]. 河北林果研究, 2003, 18(2): 157-160.
- [3] 任列花, 程三虎, 张登福. 15 个早实核桃品种花粉粒形

状、大小及生活力测定初报[J]. 北方园艺, 2005(2): 56-57.

[4] 朱立武, 孙文平, 陈家玉. 李品种花粉活力及授粉初步研究[J]. 安徽农业大学学报, 2000, 27(3): 214-216.

[5] 陈延惠, 李洪涛, 朱道圩, 等. 猕猴桃花粉生活力及其贮藏性的研究[J]. 河南农业大学学报, 1996, 30(2): 175-177.

[6] 刘会宁, 冯义龙. 桃花粉生活力的测定[J]. 特产研究, 2004(1): 14-17.

[7] 廖康, 李会芳, 许正, 等. 野生樱桃李花粉活力与授粉结实特性初报[J]. 新疆农业科学, 2008, 45(3): 393-397.

[8] 齐国辉, 张景兰, 郭军, 等. 不同核桃品种花粉生活力的比较研究[J]. 河北林果研究, 2007, 22(1): 55-56, 61.

[9] 李学强, 李秀珍, 司风云, 等. 不同贮藏条件及生长调节剂对欧李花粉生活力的影响[J]. 西北植物学报, 2007, 27(11): 2251-2256.

[10] 杨瑞, 郝燕, 王发林, 等. 葡萄花粉生活力测定[J]. 甘肃农业大学学报, 2007, 42(2): 47-50.

[11] 江雨生, 高铸九. 桃、梨花粉的超低温(-196℃)贮藏[J]. 上海农业学报, 1989, 5(1): 1-8.

[12] 何天明, 张琦, 程奇. 香梨花器特征及花粉生活力研究初报[J]. 新疆农业大学学报, 2000, 23(3): 35-38.

[13] 胡君艳, 李云, 孙宇涵, 等. 银杏花粉生活力测定及贮藏方法的优化[J]. 中国农学通报, 2008, 24(5): 148-153.

[14] Cohen E, 李荣昌. 番木瓜花粉活力及其贮藏[J]. 广西热作科技, 1990(3): 45-48.

[15] 姜雪婷, 杜玉虎, 张绍铃, 等. 梨 43 个品种花粉生活力及 4 种测定方法的比较[J]. 果树学报, 2006, 23(2): 178-181.

[16] 肖金平, 陈力耕, 叶伟其, 等. “丽槿 2 号”无核槿柑花粉育性及超微结构观察[J]. 浙江林业科技, 2006, 26(1): 36-38.

[17] 何小弟, 赵正兰, 周魁, 等. 17 种梅(桃)属观赏树木花粉生活力的比较[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2005, 29(2): 29-32.

[18] 王丽娜, 陈李林, 刘建福. 水分胁迫对澳洲坚果花粉生活力和贮藏性的影响[J]. 亚热带植物科学, 2005, 34(2): 18-20.

[19] 左丹丹, 丹军, 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.

[20] 王金祥, 陈良碧. 不同气体下贮藏的 3 种禾本科植物花粉活力和呼吸速率变化[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(2): 113-116.

[21] Sato S, Katho N, Iwai S, *et al.* Establishment of reliable methods of in vitro pollen germination and pollen preservation of *Brassica rapa* (syn. *B. campestris*) [J]. Euphytica, 1998, 103: 29-33.

[22] 张毅, 裴银伟, 郭永伟. 山核桃离体花粉活力初步研究[J]. 江苏林业科技, 2007(12): 12-14.

[23] 尹增芳, 樊汝汶, 尤录祥. 鹅掌楸花粉保存条件的比较研究[J]. 江苏林业科技, 1997, 24(2): 5-8.

[24] Reale L, Sgromo C, Bonofiglio T, *et al.* Reproductive biology of olive (*Olea europaea* L.) DOP Umbria cultivars[J]. Sex Plant Reprod, 2006, 19: 151-161.

[25] Khatun S, Flowers T J. The estimation of pollen viability in rice[J]. Exp Bot, 1995, 46: 151-154.

[26] 林玉虹, 陈显国, 周少霞. 澳洲坚果花粉活力与柱头可授性研究[J]. 中国热带农业, 2009(3): 39-42.

[27] 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.

[28] 王忠, 廖康. 植物生长调节剂对全球红葡萄花粉活力的影响[J]. 新疆农业大学学报, 2004, 27(4): 43-46.

[29] Adamowski E D V, Pagliarini M S, Batista L A R. Chromosome elimination in *paspalum subciliatum* (Notata group)[J]. Sex Plant Reprod, 1998, 11: 272-276.

[30] Abdullah M, Yousuf A M, Molla A H, *et al.* Cross compatibility between *Abelmoschus esculentus* and *A. moschatus* [J]. Euphytica, 2000, 114: 175-180.

[31] Alves E R, Carneiro V T C, Araujo A C G. Direct evidence of pseudogamy in apomictic *brachiaria brizantha* (Poaceae)[J]. Sex Plant Reprod, 2001, 14: 207-212.

[32] Chen J F, Luo X D, Jack E. Staub an allotriploid derived from a amphidiploid×diploid mating in *Cucumis* [J]. Euphytica, 2003, 131: 235-241.

[33] Nepi M, Franchi G G. Cytochemistry of mature angiosperm pollen[J]. Plant Syst Evol, 2000, 222: 45-62.

[34] 苗青, 曲波, 张春宇, 等. 文冠果花粉形态学观察及生活力研究[J]. 辽宁农业科学, 2005(3): 61-62.

[35] 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.

[36] 王国荣. 花粉萌发实验的改进报告[J]. 中学生物教学, 2002(5): 40.

[37] 曹广力, 朱越雄. 外源性糖对四种木本观赏植物花粉离体培养的影响[J]. 生物学杂志, 2002, 19(6): 22-24.

[38] 张义, 王亚莉, 陈俊杰. 低温及药剂处理对李花粉生活力的影响[J]. 湖北农学院学报, 2003, 23(4): 248-250.

[39] 宋立功, 周怀军, 王仁嫔, 等. 李树不同品种花粉生活力研究[J]. 河北林果研究, 2006, 21(1): 57-59.

[40] 王世茹, 方丽, 李建波. 不同桃树品种花粉生活力比较试验初报[J]. 河南农业科学, 2004(2): 43-44.

[41] 赵彩平, 刘娜, 韩明玉, 等. 不同贮藏温度对桃花粉生活力的影响[J]. 北方园艺, 2010(12): 50-52.

[42] 刘会超, 贾文庆. 离体萌发法测定垂丝海棠花粉生活力的研究[J]. 山西农业科学, 2007, 35(5): 39-41.

[43] 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): 365-373.

[44] 张彦琳, 张彦昌, 赵德英. 苹果自交不亲和性研究进展[J]. 山西农业科学, 2008, 36(9): 89-93.