

花粉的采集、贮藏和生活力检验*

刘武林

(东北师范大学生物系)

花粉是高等植物的雄配子体,与植物的有性繁殖密切相关[2,11],既是植物杂交育种、增加果实产量等必须重视的对象,也是蜂群培育、孢粉分析、某些药物制造和医疗、生理试验不可缺少的材料。农业工作者只有了解花粉的生物学知识,掌握了利用花粉的方法,才能够在杂交育种、花粉培养、提高果实产量等方面利用花粉来达到自己的目的[1、3、6]。本文准备在花粉采集、贮藏和生活力检验三方面作一些介绍。

一、花粉采集

花粉大小的差异很大,有人统计过586种欧洲生长的植物花粉的大小分布情况,花粉直径小于 10μ ,大于 70μ 的种类不超过20种,仅不及总数的3%,花粉直径接近 30μ 的种类超过200种,占总数30%以上,它们的分布曲线如图1[18]。

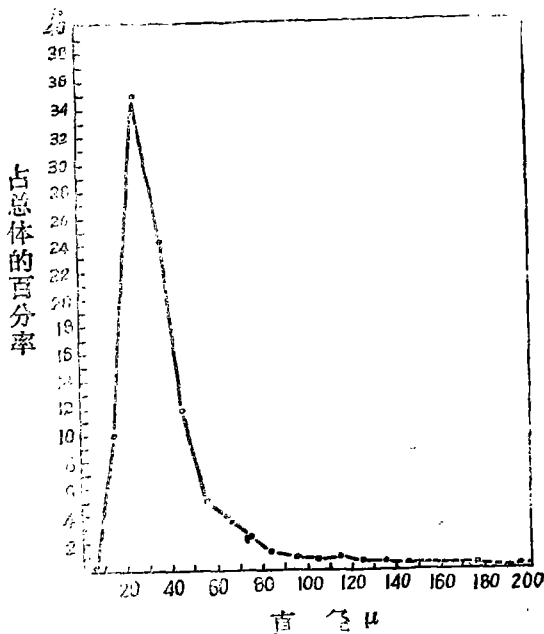


图1 586种植物花粉的大小情况

一般说来,风媒花粉粒的平均直径大致在 $17\sim 58\mu$ 之间,虫媒花粉粒的大小变动却很大。勿忘草的花粉粒平均直径才 5μ ,南瓜花粉粒的直径却大到 200μ 以上,相差超过40倍。表一列举了几种植物花粉大小、重量的差异情况[18]。

花粉的数量常用立方厘米来计算,Snyder和clausen(1973)曾汇集过几个属的花粉产量[17]。实际上除了以每朵花或每个柔荑花穗为单位比较产粉量外,应该了解每株植物的产粉量来估计植株的产粉能力。如玉米每株产粉量能达到 10^7 粒,它们通常超过虫媒花很多,水媒花植物的花粉产量最少,以苦草属为例,每株才生产 $72\sim 144$ 粒花粉。

* 本文系吉林省园艺学会1981年年会报告的论文。
本刊摘登了有关栽培植物的材料。

表 1 几种植物花粉粒的大小和重量

植物种类	长 μ	宽 μ	高 μ	体积 10^{-9} Cm ³	重 10^{-9} 克
白皮冷杉	97.8	102.9	62.7	499.4	251.6
欧洲赤松	41.5	45.9	36.0	35.5	37.0
落叶松	76.0	72.0	50.0	180.2	176.3
瘤 桦	10.1	10.1	16.8	2.9	0.8
阔 叶 椴	40.5	40.1	20.6	15.0	6.5
玉 米	116.3	107.3	107.3	702.4	247.0
西 葫 芦	213.8	213.8	213.8	5117.0	1068.0

采集花粉的时间要与花药开裂的时间相适应，花药开裂的时期主要决定于植物的遗传特性。例如，采集花粉一天中最好的时期：虞美人 5 : 30~10时，野蔷薇、蔷薇为 6 : 30~10 : 30时，马鞭草 7~11时，三色田旋花 8~14时。

一般说来，植物散粉期间所采集到的花粉生活力没有很大的差异，在散粉中期得到的花粉，生活力最强。外界环境对花粉生活力的影响很大，温度和湿度是最重要的因素。

温度过高或过低不利于花粉成熟，花粉生活力也降低。低温高湿抑制花药开裂。缺水、缺硼花粉生活率降低。光照减弱，光周期不正常直接影响花药中贮糖量的减少，花粉生活力降低。紫外线照射可降低一些植物的花粉生活力，但风媒花的花粉耐紫外线能力特别强。杀虫、杀菌剂和SO₂等工业废气的污染对花粉生活力影响很大，因而采集花粉要尽量避开环境污染的地区，花粉采集后要在散光、弱光或黑暗下干燥。花粉在采集过程中被微生物污染是遭致花粉失活和不耐贮藏的重要原因。因此采粉用的器具要干净清洁，采集到的花穗、花药要进行表面消毒、无菌水冲洗。

杂交和生产用的花粉纯度要求较高，采集这种花粉要注意隔离粉源，避免它种植物花粉的污染。采集时先根据花穗发育的形态、色泽特点，摘下花药将要开裂的花穗，再把花穗放在具有筛网的容器中通风干燥，花药开裂后筛出散落的花粉，放到贮藏容器中贮藏。

直接剪取花枝到室内，使花粉成熟、花药开裂和散粉都在人为控制的环境中进行，可以加速花粉成熟，提早采粉时间。剪取的花枝在离体培养中还可以人为控制营养条件，或在花粉中引进特殊的物质（如P³²等）供特殊的用途。

二、花粉贮藏

为了随时随地都可利用花粉，必须进行花粉贮藏。公元前两千年前就有过运输海枣花粉的记载，Visser (1955) 等曾评述过花粉贮藏的文献 [12]。许多种花粉在贮藏中很容易丧失生活力，因此贮藏花粉必须了解影响花粉生活力的条件。

1、一般贮藏中影响花粉生活力的条件

常规贮藏花粉的方法是将花粉置于干燥低温下保存。贮藏期间的相对湿度、温度、大气成份是影响花粉生活力的主要因素。

A、相对湿度：一般地说贮藏期间相对湿度较低，有利于贮藏。在成熟的花粉中，由于水分含量低，代谢活动受到抑制，酶的活性减弱，呼吸作用降低，因而能维持较长的生命活动能力。不同种的花粉要求适宜的湿度不同，很难概括出一个总的适宜湿度。从多数研究者的贮藏试验来看，一般贮藏期的相对湿度与花粉寿命呈负相关；在相对湿度大约降低到 6% 以前贮藏寿命常常是随湿度减低而延长。Visser (1955) 用西洋梨花粉在 3℃ 下所作的研究清楚的表明了这种关系 (图 2)。

许多植物种的花粉粒在湿度太高或太低时都容易丧失生活力，大多数花粉最适湿度在

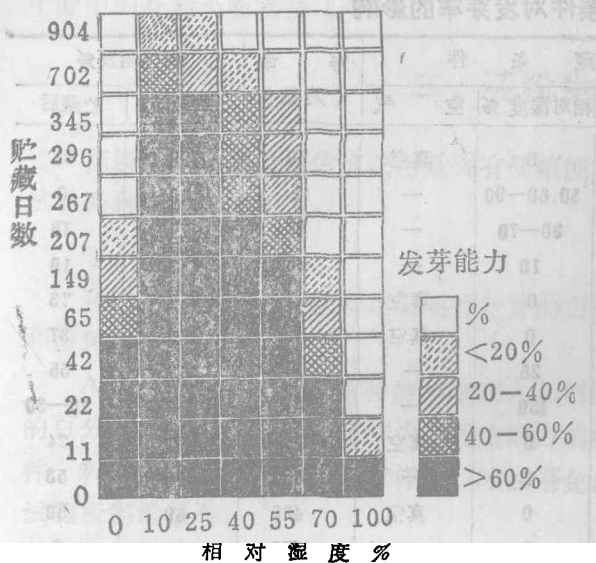


图2 西洋梨品种Clapps favorite的花粉贮藏
在3℃时相对湿度对花粉离体发芽率的影响

60%以下。例外的是禾本科植物的花粉极不耐干燥。它们的外壁薄，缺乏防止水分丢失的物质，再加以成熟的花粉具有三核，花粉粒中代谢库的贮量很低，所以禾本科植物的花粉既不耐干燥，寿命也极短暂。一般干燥情况下，存活不超过24小时。例如水稻在10℃和85%的相对湿度下只能保存24小时。有些植物如郁金香、君子兰等的花粉贮藏时含水量不能低于40%以下，而有些植物如翠雀的花粉不论在高湿度或低湿度下都能存活良好。但大多数植物的花粉都不耐贮藏中湿度的剧烈改变。

多种植物花粉贮藏的研究结果指出，在温度为0℃时，花粉寿命确能延长。低温能够延长花粉的贮藏期，但是低温下贮藏的花粉含水量是很重要的。如果在花粉贮藏期降低温度同时又降低相对湿度则更能延长贮藏期。禾本科作物的花粉对贮藏温度的要求又是例外，Walden (1967) 等研究证明，玉米花粉在低湿度和低温度下(-17℃以下)仍不利于贮藏[19]。

B、温度：温度是影响花粉贮藏的另一个重要因素。表2中列出

花粉在极低的温度下(-180℃到-270℃)可以假设细胞活性接近于零，理论上它们的生活力可以长期保存。据观察推论，羽扇豆的花粉保存在-180℃下可以生存一百万年。当一切生化活动停止时，对于生命来说，时间就等于没有变化了。

C、大气成份和大气压力：贮藏期间花粉四周的大气成份对花粉生活力的影响以CO₂和O₂的影响研究较多。大气中CO₂浓度增加有利于花粉的贮藏，O₂浓度的增加不利于花粉贮藏。降低贮藏器中的气压，尤其是降低O₂的分压，能够延长花粉贮藏期。花粉在真空中贮藏一般都能延长贮藏期，1972年报导，苜蓿花粉在真空中21℃条件下能存活11年，突破了六十年代苹果、西洋梨花粉贮存9年的纪录[1]。

2、花粉冻干贮藏

冻干贮藏法是较好的花粉贮藏技术。花粉冻干后能较长期的在室温下保存。虽然这种花粉的生活力低于新鲜花粉，但它仍能保持受精结籽所需要的发芽百分率。

冻干花粉的方法不同于真空干燥法。后者是将花粉直接减压干燥，而前者是先用低温(-60℃到-80℃)将花粉冰冻，然后减压到50~250毫米汞柱下将水分升华干燥。冻干的花粉能在室温下真空贮藏或充氮贮藏。一般冻干贮藏的花粉，发芽率比新鲜花粉低，使用冻干花粉时必须首先把它再度吸水，否则直接使用冻干花粉会大大降低发芽力。冰冻干燥时初始冰冻速度必须放慢，以使细胞全面结晶。否则开始主要在细胞外部结冻，容易伤害细胞。

表 2

花粉贮藏条件对发芽率的影响

植 物 名 称	贮 藏 条 件			寿 命 (天 数)	离体萌发%	
	温度 ℃	相对湿度 %	空 气		贮藏前	贮藏后
南瓜 <i>Cucubita moschata</i>	-17	0	真空	30	98	98
大麦 <i>Hordeum vulgare</i>	+10	30.60-90	—	1	40	0
多叶羽扇豆 <i>Lupinus polyphyllus</i>	-190	30-70	—	93	78	78
番茄 <i>Lycopersicum esculentum</i>	+2-+4	10	—	252	47	10
紫苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	-17	0	真空	34	88	73
櫻桃 <i>Prunus avium</i>	-17	0	真空	410	53	37
" "	0	25	—	550	57	55
杏 <i>P.armeniaca</i>	+2-+8	50	—	912	60-80	20-30
扁桃 <i>P.Communis</i>	-17	0	真空	1130	91	24
" "	+2	0	—	550	70	53
洋李 <i>P.domestica</i>	-17	0	真空	435	69	60
" "	+10-+30	0	—	400	76	5
桃 <i>Prunus persica</i>	0	50	—	550	85	42
柳梨 <i>P.Salicina</i>	-17	0	真空	439	40	35
西洋梨 <i>P.Communis</i>	-17	0	真空	419	77	65
" "	+2-+4	10	—	662	66	42
" "	+2-+4	0	真空	1032	64	15
" "	-20	0	"	1032	64	50
" "	-190	0	"	662	64	50
" "	-17-+37	5	—	3287	—	1
苹果 <i>Malus</i>	-17	0	真空	385	92	64
" "	+10-+30	0	—	400	93	7
" "	+2-+8	50	—	1461	70-80	20
" "	+2-+8	10	真空	673	76	70
" "	-20	30-70	"	673	76	63
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	+10	25	—	365	43	10
" "	+2	25	—	730	43	7
" "	-12	28	—	1461	43	12
玉米 <i>Zea mays</i>	+4	90-100	—	8	90	60-70

3、花粉在有机溶剂中贮藏

在没有冷冻或空调设备下,将花粉直接放到有机溶剂中贮藏、转运是一种新的贮藏技术[4]。这种贮藏方法简单易行,但根据目前的试验结果,不同种类的花粉和不同种类的溶剂效果不一。例如芸苔属花粉经有机溶剂贮藏后,发芽虽然很好,但处理的花粉都不能正常结籽,因此在采用此项贮藏方法时,需要积极审慎的试验。岩波(1972)曾用山茶花粉贮藏在5℃的多种有机溶剂中,三天后测定花粉的发芽率表明:贮藏在苯、异丁醇、丙酮、乙酸戊酯、乙酸乙酯、正戊醇、正丁醇、三聚乙醛、石油苯、1,1,1-三氯乙烷、异戊基醚、二乙醚、石油醚、正己烷、正戊烷、异戊烷、甲苯、二甲苯中的效果都很好,它们的发芽率都在90%以上,非常接近新鲜花粉的发芽率(98.9%)。贮藏在丙酮、乙酸甲酯、异丙醇、四氯化碳、二乙烷、己烷中的花粉发芽率都超过50%,但在苯乙醇、乙醇、

甲醇中的花粉不能发芽 [5]。

三、花粉生活力检验

花粉生活力检验是估价花粉是否有受精能力的重要方法。一般可分发芽试验和不发芽试验两种。兹分述如下：

1、发芽试验

花粉发芽试验是用观察花粉能否发芽的方法来评价花粉的生活力。可分为体外鉴定法和活体鉴定法两类。

A、体外鉴定：抽取花粉的样本在人工创造的环境下发芽，用显微镜观察产生花粉管的百分率，用这个百分率来作为花粉生活力的指标。这种方法必须创造适合花粉的发芽条件，科学的从花粉总体中抽取样本，才能避免出现差误。表3列出多种植物花粉体外发芽试验所需的条件。

表3 花粉体外发芽所需的条件

种	温度 ℃	营 养	培养基
玉米 <i>Zea Mays</i>	27	15%蔗糖, CaNO ₃	0.7%琼胶
黑麦 <i>Secale cereale</i>	27	25%蔗糖, B	0.6%琼胶
甜菜 <i>Beta Vulgaris</i>	20	30%蔗糖, B	6%明胶, pH5
黑核桃 <i>Juglans nigra</i>	27	20%蔗糖, B, 光	水
花烟草 <i>Nicotiana glauca</i>	30	10%蔗糖, B	水

注：B为硼酸，用量浓度0.01%

体外发芽鉴定法按所采用的器具和操作方式大致可归纳为悬滴法、点试法、凹坑法、琼胶法和膜试法五种。

悬滴法：是比较简单易行的方法。滴一滴培养液在玻片上，花粉置于培养液滴上，用玻管将它密封以避免培养液的蒸发。花

粉在悬滴中的发芽情况可以直接在显微镜下计数。

悬滴法虽然简单易行，但由于液滴呈圆球形，培养液滴上的花粉或者在表面集中，或者沉到液滴中，更加以各密封室的条件不容易一致，因而发芽率的变差很大，容易引起误差（图3A）。

点试法：是在培养皿底部用凡士林作一系列小圆圈，圈的内径约5毫米。培养液注入圈内，洒上检验的花粉粒，盖上培养皿，保持湿度，在一定的条件下培养。由于这种方法可以在同一个培养皿中培养多个试点，各试点的培养条件也比较一致，因而误差比悬滴法小（图3B）。

如果用塑料培养皿作点试法检验花粉，可免去凡士林作圆圈的工序，直接将培养液滴在器底上。100—200μl的液滴很容易在皿底上保持完整的半球形，花粉在液滴上发芽。

凹坑法：是在载片或培养皿底部作出凹坑，花粉在有培养液的凹坑中培养。最简单的凹坑法是直接在有凹坑的玻片上进行培养试验。凹坑顶部盖上玻片防止蒸发。

大量检验时，可以在培养皿底部浇上一层蜡，用钻孔器钻成多数孔穴，培养液注入孔穴中培养花粉发芽。这种方法有利于显微检视时翻转培养皿进行（图3C）。

琼胶及明胶法：用琼胶或明胶按花粉对不同营养成份的需要配制成固体培养基。这种培养基能够提供良好的好气条件，对花粉的发芽特别有利。发芽条件也均匀一致，因而与实际发芽率的误差最小（图3D）。

膜试法：用一片能透析的膜浮在溶液上或挂在潮湿的瓶中，花粉在浸有培养液的膜上发芽。这种方法可以在培养期间更换培养液，是其它方法做不到的。有些种类的花粉在膜上发芽比任何其它体外发芽方法的效果都好（图 3 E）。

用显微镜检查花粉的发芽情况时，凡是花粉管长出的长度超过花粉粒直径时才算发芽，否则只算膨胀。体外发芽试验引起误差的原因很多：高密度的花粉会抑制发芽，一定的花粉群集又会产生花粉集体效应而刺激发芽生长。液滴培养时中央的花粉密度高，外缘的低；沉到液滴底部的花粉粒因供气不良发芽率低。发芽期间的微生物侵染，化学物质或代谢产物的抑制，检验时不正确的操作方法都会引起不正确的结果，因此检验时必须注意。由于体外发芽条件的限制，所测得的发芽率往往比实际生活力低，而且不同的方法，不同重复间所得的数据的变差也较大，因此，对结果数据进行统计分析是必要的。

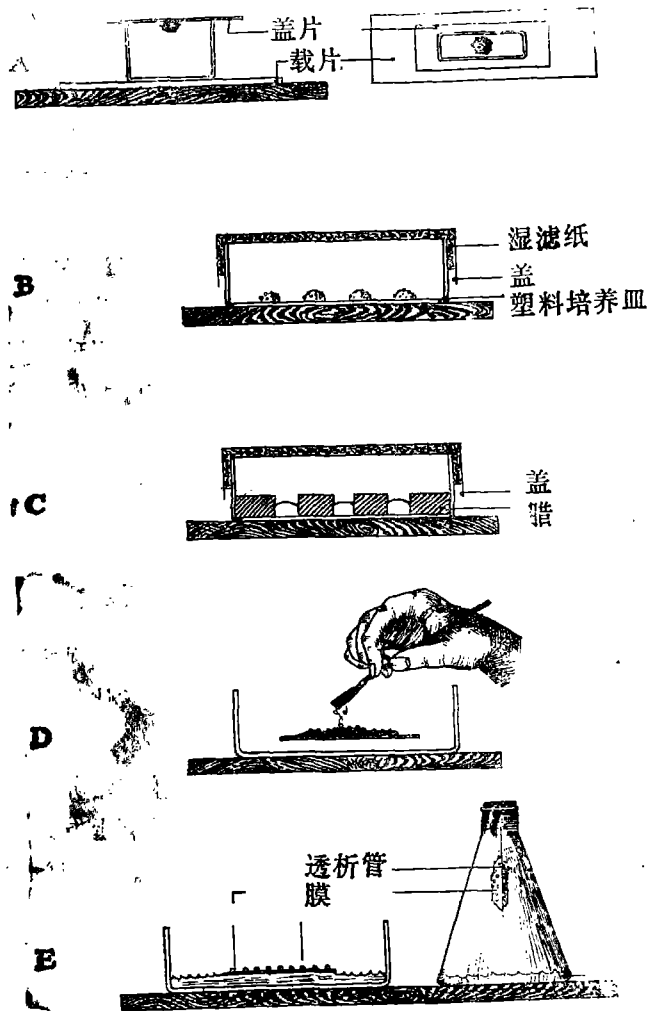


图 3 花粉离体发芽的方法

B、活体鉴定法：活体鉴定法是将试验花粉授与植株雌性器官，观察花粉的发芽情况或母体的结实情况来确定花粉的生活力状态。当离体发芽试验可能因为培养基营养不适等原因而抑制花粉生长或长出的花粉管过短时，就必须活体试验鉴定。活体发芽试验要选择适合的柱头或珠孔，授粉后观察柱头中的花粉萌发状态或受精结实状态。有些植物如棉花至今还必须用活体鉴定法才能检查它的花粉生活力 [13]。但也要注意有些植物的花粉活体萌芽鉴定效果并不理想，如十字花科植物的柱头上有角质层会阻止花粉的萌发。

具体的活体花粉发芽鉴定方法是将试验鉴定的花粉向相应的柱头授粉，隔一定时间后切下花柱，染色压片观察，数计花柱内花粉管的数目与柱头上未发芽的花粉粒数目相比较，则得到花粉在活体上的发芽率。由于花粉管胼胝质易与荧光染料结合，应用荧光染色法在紫外显微镜下观察是比较灵敏和易于操作的。

用种子形成的能力——种子发育指数来判断花粉的生活力可以说在理论上是最可靠的标准。但这个方法要求技术太

高, 太浪费时间, 试验过程中的中间干扰因素很多, 所以除非极端必要一般并不采用。

植株授粉时每个柱头上接受的花粉数目较多, 其中只要有一粒花粉萌发就可能结实。离体发芽鉴定时发芽率很低的花粉在柱头上具有一粒有生活力的花粉的机会是很多的。Visser (1955) 曾经观察过苹果、梨和番茄等植物的结实数与离体花粉发芽率间的关系。西洋梨品种 *Clapps favorite* 的花粉发芽率为20%时, 授粉后极少结实, 40%发芽率的花粉就可能结实适中, 60%的授粉后结实率就可以达到正常。

2、不发芽鉴定法

为了简便快速的鉴定花粉生活力, 发展了不发芽鉴定法。鉴定花粉生活力不经过发芽过程, 便省去了许多保证发芽条件的技术要求, 也节省了发芽所耗费的时间。在乳酸酚中苯胺兰对胼胝质染色有特效, 玫瑰红甲基绿、碘化钾、醋酸洋红等染料都可以各与花粉中不同的组成物质着色。但从鉴定生活力的标准来看, 用这些染料来区别有生活力和无生活力的花粉尚不够精确。胼胝质和淀粉染色法用得最广, 但也只能用于粗略的估计。

氧化还原染料能够在呼吸酶的作用下着色, 从而在检验花粉生活力上特别优越。例如: 2、3、5-氯化三苯四氮唑、三苯四唑红 [16]、亚硒酸氢钠等能在还原酶的作用下由无色变成红色, 二氨基联苯和愈伤木酚能在过氧化物酶的作用下变色, 这方面都有过试验。其中2、3、5-氯化三苯四氮唑 (TTC) 的效果最好。TTC渗入花粉活细胞后, 作为受体被脱氢酶所还原, 由无色的氧化型转变为红色的三苯甲腈。因而活的花粉粒呈红色, 丧失生活力的花粉粒没有颜色, 在显微镜下很容易区分。TTC溶于水, 操作简便, 用0.15M Tris-HCl缓冲液 (pH7.8) 配制成1%的TTC溶液在5℃下遮光贮存, 可以保持三个月稳定不变。一般使用浓度在0.1%到1%之间。

根据Hauser等的试验 [10], 用TTC测定花粉的生活力, 对很多种植物的效果都很好, 但有些植物的反应不够准确。效果较好的植物种类有: 陆地棉、向日葵、玉米、多种松树、番茄属、茄属、辣椒属中的一些植物。效果不理想的植物种类有: 苹果、桃、杏、欧洲櫻桃、葡萄及梨属中一些植物。洋李花粉生活力试验结果不一, Porlingh (1956) 认为不准确, Norton (1966) 认为溴化二苯基四唑很准确 [14], 结果还需要进一步验证。

在花粉生活力检验中利用特种酶反应的其它染色方法还有许多报导。Hauser和Morison (1964) 报导过硝基四唑兰对琥珀酸脱氢酶有特效, 在被子植物13个分类群的花粉试验中表明它鉴定花粉生活力的效果很好 [10]。Sinke等 (1954) 报导过对细胞色素氧化酶有特异的Na-di反应。此外刃天青、萤光素二醋酸酯等都可能检验花粉生活力方面很有前途。总之, 这种便利而快速的试验花粉生活力的方法定会加速发展。

参 考 文 献

- [1] 杨弘远 1978 花粉研究的新进展 植物杂志 2期、3期、4期连载
- [2] 杨弘远 1980 花粉发育的两条途径 生物科学动态 92期, 4页
- [3] 汪劲武 1980 植物传粉的适应 生物学通报, 27页
- [4] 岩波 1957 Botan. Mag. 东京, 70, P. 144
- [5] 岩波 1972 Plant Cell Physio. 13, P11, 39
- [6] Brooks J. Shaw G. 1971 Pollen development and physio Butterworth. London
- [7] Ching T.M. Ching K.K. 1966 Plant Physio. 39, P. 705
- [8] Ching T.M. Slabaugh W.H. 1966 Cryobiology, 2, P. 321

- (9) Hanson C.H., Campbell T.A.1972 Crop Sci, 12, P.874
 (10) Hauser and Morrison 1964 Amer.J.Botany 51p.784
 (11) Leopold Garl 1964 Plant growth and development, P.250
 (12) Linskens H.F.1964 Ann.review Plant Physio, 15, P.255
 (13) Miraville R.J.1965 Empire Cotton growing nev. 42, P.287
 (14) Norton J.D.1966 Pro.Amer.Soc. Hort. Sci, 89, P.132
 (15) Ohno H.P.1942 Pro. Amer. Soc. Hort. Sci, 41.P.219
 (16) Sarvella P.1964 J.Heredity 55, 154
 (17) Snyder E.B., Clausen K.E.1973 Wood—Plant seed manual
 (18) Stanley R.G., Linskens H.F.1974 Pollen, P27, 28, 60
 (19) Walden D.B.1967 Crop Sci7, P. 441,

《中国农业科学》一九八二年征订启事

《中国农业科学》是中国农业科学院主办的综合性农牧业科学学术性刊物。主要任务是以马列主义、毛泽东思想为指导，反映我国农牧业科学的重要成果，促进国内外学术交流。

本刊主要报道我国农牧业科学在基础理论和应用技术研究方面的学术论文，重要科研成果的专题报告，各学科研究的新进展和综述等。读者对象主要是国内外农牧业科技工作者和院校师生，农业生产战线上的干部等。

本刊为双月刊，每期定价0.52元，全年3.12元。向国内外发行，全国各地邮局办理订阅。代号：2—138。

《黑龙江农业科学》一九八二年征订启事

《黑龙江农业科学》一九八二年将主要报导作物育种、耕作栽培、植物保护、土壤肥料、果树蔬菜、生物物理、品种资源、环境保护、农化分析以及科研管理等方面的学术论文，研究报告，调查总结和生产建议，译文综述等文章，特别是针对我省自然和生产特点，在防御低温冷害、机械化耕作栽培、三江平原的开发利用、低产土壤的改良等方面，将重点报道。

本刊对各级农业领导机关、农业科研院所、农业院校和中专师生、农业生产单位和国营牧场的广大科技人员，都有参考价值。

本刊一九八二年为双月刊，十六开本，每期六十页左右，定价三角五分，全年二元一角。在全国公开发行，请到全国各地邮局订阅。

刊号：14—61