

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202011026

白晓珊, 仝伟, 王建毅, 等. 泥炭地苔藓植物孢子生活力的快速检测 [J]. 广西植物, 2022, 42(4): 676-681.

BAI XS, TONG W, WANG JY, et al. Rapid viability detection of peatland bryophyte spores [J]. *Guihaia*, 2022, 42(4): 676-681.



泥炭地苔藓植物孢子生活力的快速检测

白晓珊^{1,2,3}, 仝伟⁴, 王建毅^{1,2,3}, 卜兆君^{1,2,3*},
刘文静^{1,2,3}, 夏尤普·玉苏甫^{1,2,3}, 徐雪莹^{1,2,3}

(1. 长白山地理过程与生态安全教育部重点实验室, 东北师范大学 地理科学学院, 长春 130024; 2. 国家环境保护湿地生态与植被恢复重点实验室, 东北师范大学 泥炭沼泽研究所, 长春 130024; 3. 长白山湿地生态过程与环境变化吉林省重点实验室, 长春 130024; 4. 吉林哈泥国家级自然保护区管理局, 吉林 通化 134100)

摘要: 适量的烟气能够促进有性繁殖体萌发,但迄今尚无辅助烟气处理探究孢子生活力快速检测方法的研究报道。该文选择毛缘泥炭藓 (*Sphagnum fimbriatum*)、中位泥炭藓 (*S. magellanicum*) 和粗叶泥炭藓 (*S. squarrosum*) 作为材料,分别使用亚甲基蓝染色法、四唑 (TTC) 染色法、碘-碘化钾 (I₂-KI) 染色法和红墨水染色法对泥炭藓孢子进行染色,并比照营养液、烟溶液+营养液培养的孢子萌发试验,对比研究泥炭地苔藓植物孢子生活力快速检测的最佳方法。结果表明:亚甲基蓝染色法的染色效果最为明显,TTC 和 I₂-KI 均未能使泥炭藓孢子着色,孢子对红墨水虽有着色反应但不清晰;与营养液培养相比,添加烟溶液使毛缘泥炭藓、中位泥炭藓和粗叶泥炭藓孢子萌发率分别提高 5%、5% 和 18%;使用亚甲基蓝染色的孢子染色率与经烟溶液处理过的孢子萌发率最为接近。综上认为,亚甲基蓝染色法能快速检测泥炭藓孢子的生活力。

关键词: 泥炭藓孢子, 萌发率, 烟气, 生活力, 快速检测

中图分类号: Q945.34 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)04-0676-06

Rapid viability detection of peatland bryophyte spores

BAI Xiaoshan^{1,2,3}, TONG Wei⁴, WANG Jianyi^{1,2,3}, BU Zhaojun^{1,2,3*},
LIU Wenjing^{1,2,3}, Shuayib YUSUP^{1,2,3}, XU Xueying^{1,2,3}

(1. *Key Laboratory of Geographical Processes and Ecological Security in Changbai Mountains, Ministry of Education, School of Geographical Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024, China*; 2. *State Environmental Protection Key Laboratory of Wetland Ecology and Vegetation Restoration, Institute for Peat and Mire Research, Northeast Normal University, Changchun 130024, China*; 3. *Jilin Provincial Key Laboratory for Wetland Ecological Processes and Environmental Change in Changbai Mountains, Changchun 130024, China*; 4. *Jilin Hani National Nature Reserve Administration, Tonghua 134100, Jilin, China*)

Abstract: Appropriate amount of smoke can promote germination of sexual propagules. However, rapid detection of spore viability combined with smoke treatment has not been reported up to now. In this paper, *Sphagnum fimbriatum*, *S. magellanicum* and *S. squarrosum* were selected as study species. Methylene blue, TTC, I₂-KI and red ink were used to dye

收稿日期: 2021-02-09

基金项目: 国家自然科学基金 (41871046, 41471043); 国家重点研发计划项目 (2016YFC0500407); 吉林省科技发展计划项目 (20210402032GH) [Supported by National Natural Science Foundation of China (41871046, 41471043); National Key R & D Program of China (2016YFC0500407); Jilin Provincial Science and Technology Development Program (20210402032GH)].

第一作者: 白晓珊 (1994-), 硕士研究生, 主要研究方向为地理科学、地理教育, 现工作于东北师范大学附属中学, (E-mail) baixs351@nenu.edu.cn.

*通信作者: 卜兆君, 博士, 教授, 主要研究方向为湿地生态学、植物生态地理学, (E-mail) buzhaojun@nenu.edu.cn.

spores, and nutrient solution and smoke + nutrient solution were used to culture spores, to test which is optimal method for rapid detection of peatland *bryophyte* spore viability. Of the four methods, methylene blue showed the most obvious dyeing effect while TTC and I₂-KI did not dye the *Sphagnum* spores and the spores had no clear and sharp reaction to red ink. Compared with those cultured with nutrient solution only, spores cultured with smoke + nutrient solution increased their germination by 5%, 5% and 18% in *S. fimbriatum*, *S. magellanicum* and *S. squarrosum*, respectively. The frequency of *Sphagnum* spores dyed with methylene blue was the closest to that of spores germinated after smoke solution treatment. The results indicate that methylene blue dyeing is an ideal method to quickly detect viability of *Sphagnum* spores.

Key words: *Sphagnum* spores, germination percentage, smoke, viability, rapid detection

植物种质资源保存,特别是植物有性繁殖体(种子和孢子)的保存是各种迁地保护措施中最为经济有效的方法,在减缓气候变化对生物多样性的影响中发挥了关键作用(Li et al., 2011)。生活力维持是植物有性繁殖体保存的关键。国际上已有一些快速检测植物有性繁殖体生活力的方法,主要包括物理特性检测法(Zhao et al., 2016)、生理检测法(Manju & Kumar, 2015)、生物化学检测法(胡晋等,2009; Magrini et al., 2019)以及逆境检测法(Komba et al., 2006)等。在众多生活力检测方法中,染色测定法最为快速且简单。该方法利用有性繁殖体中的胚对染色剂的不同反应,来判断繁殖体有无生活力,应用比较普遍的如四唑(TTC)染色法(Kaiser et al., 2014; Ma et al., 2019)、噻唑蓝(MTT)染色法(李峰等,2016)、亚甲基蓝染色法(Aniszewski et al., 2012)、I₂-KI染色法(Du et al., 2018)和红墨水染色法(吴正军等,2012;苏芸芸等,2016)等。

传统的种子生活力的检测通常采用室内萌发试验,以萌发率表征生活力。此方法操作要求高、耗时较长,且休眠往往低估了种子的真实生活力。苔藓植物中,孢子的生活力也常采用萌发率来衡量(Bu et al., 2017)。李秋萍等(2013)曾采用6种非泥炭地苔藓植物为受试物种,开展生活力快速检测研究,通过对比染色率和萌发率发现,亚甲基蓝染色法是测定藓类植物孢子生活力的有效方法。但目前,关于泥炭地苔藓植物孢子生活力测定的研究很少。

由于适量的烟溶液浸泡能够有效促进苔藓植物孢子的萌发,提高孢子萌发率(康媛等,2019),因此能够更为准确地通过萌发率来估测生活力。目前,关于结合烟气处理探讨快速检测苔藓植物孢子生活力方法的研究尚未见报道。本研究选择4种常用于种子生活力快速检测的染色法,以3种泥炭藓属(*Sphagnum*)植物为试验材料,结合烟溶

液浸泡孢子进行解眠,尝试寻找测定泥炭地苔藓植物孢子生活力的简单、快捷的方法,为未来苔藓孢子生态学研究提供基础支撑。

1 材料与方法

1.1 孢蒴材料采集

研究采用的受试物种为毛缘泥炭藓(*Sphagnum fimbriatum*)、中位泥炭藓(*S. magellanicum*)和粗叶泥炭藓(*S. squarrosum*)。2018年7月,于小兴安岭东段南坡的汤北林场泥炭地(129°04' E, 48°25' N)采集毛缘泥炭藓和粗叶泥炭藓的孢蒴;于长白山西麓哈泥泥炭地(126°31' E, 42°13' N)采集中位泥炭藓孢蒴。孢蒴采回后,均放入冰箱4℃暗保存。

1.2 烟溶液制备

锈色泥炭藓(*S. fuscum*)为哈泥泥炭地常见物种,易于采集,以该植物为材料制备烟溶液。将390g锈色泥炭藓置于不锈钢炉中燃烧,产生的烟气通过导管导入装有350mL蒸馏水的瓶中直到烟气溶液饱和,作为烟储备液,室温密闭保存。

1.3 试验设计

1.3.1 孢子初始萌发率与生活力测定 孢子悬液的制作参照康媛等(2019)的方法,3次重复。将接种孢子悬液的培养皿置于PRX-450C型人工气候箱中。温度周期、光照周期和光强周期依次设为27℃/22℃、16h/8h以及8000lx/0lx,空气相对湿度为60%(Bu et al., 2017)。于培养的第21天(Feng et al., 2017),显微镜下统计萌发率。

1.3.2 不同染色方法的比较 挑选发育成熟且保存完好的3种受试物种的孢蒴,分别置于12个烧杯中(4种检测方法×3个物种),充分捣碎以备染色使用。

1.3.2.1 亚甲基蓝染色法 亚甲基蓝染色剂的配制参照杨发君等(2010)的方法,浓度配置成0.1%。

分别取 2 mL 染液依次滴入装有 3 种泥炭藓孢子的烧杯中,搅拌均匀,静置染色 2 h。染色结束后,利用 5 cm × 5 cm 的聚乙烯筛布将孢子从染液中过滤出,利用 3 mL 蒸馏水反复冲洗制成孢子悬液。取 1 mL 滴入制作好的培养皿中(3 个重复)。显微镜下统计染色率。孢子若染成蓝色,则计为有生活力,未染色的则计为无生活力。

1.3.2.2 TTC 染色法 TTC 染液的配制方法参照张志良等(2003)的方法,浓度配制成 0.5%,避光保存。染色过程与观察方法同上。若染成红色,则认为其具有生活力,其他情况认为孢子无生活力。

1.3.2.3 I₂-KI 染色法 参照胡晋等(2009)对种子生活力的测定原理和方法,染色过程及观察方法同上。若孢子壁呈淡蓝色,计为有生活力,否则计为无生活力。

1.3.2.4 红墨水染色法 红墨水用蒸馏水 20 倍稀释,制成 5% 的红墨水染液(张志良和瞿伟菁,2003),染色时长设定为 1 h,并进行水浴处理,温度设定为 35 ℃。孢子若被染成红色,则计为无生活力,否则计为有生活力。

1.3.3 烟溶液处理对染色结果的影响 将制作好的孢子小包(参照 1.3.1)置于烟溶液中,浓度设置同 1.3.1,浸泡 24 h。对照为未经烟溶液浸泡处理直接染色的孢子。浸泡结束后,用蒸馏水冲洗小包外部,并将每种泥炭藓的 4 个孢子小包分别用上述染液反复冲洗置于干净烧杯中。重复 1.3.2 试验内容,观察孢子的染色率,并与 1.3.2 中的染色结果进行对比。

1.4 数据处理

使用 SPSS 24.0 软件对数据进行统计分析。不同染色法的染色率差异、烟溶液处理与未经烟溶液处理的萌发率差异、经烟溶液处理与未经烟溶液处理的染色率差异以及染色率与加烟溶液或未加烟溶液培养的萌发率差异,均采用 *t* 检验($\alpha=0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同染色方法的效果比较

使用 4 种不同的染色方法对 3 种泥炭藓孢子进行染色试验,以测定孢子的生活力,试验结果见表 1。试验发现,TTC 染色法和 I₂-KI 染色法对 3 种泥炭藓孢子均无效果(图 1:b, c),即使延长染色时间等处理也无法使孢子着色。红墨水染色法

虽然能够使孢子着色,但需要进行 1 h、35 ℃ 的水浴处理(图 1:d),从而使试验增加了复杂性。然而,利用亚甲基蓝染色法处理的孢子(图 1:a),染色效果十分明显,且清晰度很高。

表 1 4 种染色方法的效果比较
Table 1 Comparison among four dyeing methods

染色方法 Dyeing method	有生活力 With viability	缺少生活力 Without viability	清晰度 Clarity	染色时间 Dyeing time
亚甲基蓝染色法 Methylene blue	呈蓝色 Blue	不着色 Undyed	清晰 Clear	2 h
四唑染色法 TTC	不着色 Undyed	不着色 Undyed	—	2 h
碘-碘化钾染色法 I ₂ -KI	不着色 Undyed	不着色 Undyed	—	2 h
红墨水染色法 Red ink	不着色 Undyed	呈红色 Red	欠清晰 Less clear	35 ℃ 水浴 1 h Bathing at 35 ℃ for 1 h

注: — 表示孢子染色效果无法判定。

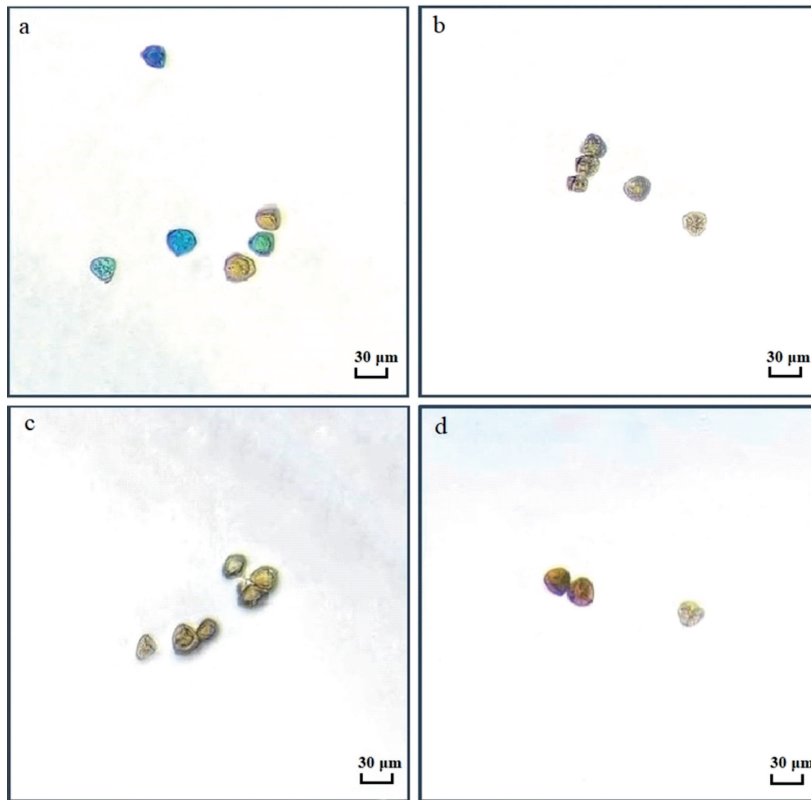
Note: — represents that dyeing results of spores are difficult to determine.

2.2 孢子萌发率的测定

培养 21 d 观察发现,烟溶液的处理对 3 种泥炭藓孢子的萌发率都存在显著的正效应(表 2)。其中,烟溶液的处理使毛缘泥炭藓和中位泥炭藓孢子的萌发率提高均在 5% 以上,经烟溶液处理过的孢子萌发率与对照相比具有显著差异($P<0.05$, 表 2)。由表 2 可知,烟溶液处理对于粗叶泥炭藓孢子的促萌作用最明显,且表现出极显著的差异性($P<0.001$)。

2.3 染色率与萌发率的比较

3 种泥炭藓孢子经 4 种不同的染色方法处理后所得的染色率差异均达到显著水平($P<0.05$)。由表 2 可知,亚甲基蓝、I₂-KI 和 TTC 染色法的染色率及红墨水染色法的未染色率与 3 种泥炭藓孢子的初始萌发率之间都存在着显著差异。在染色效果较好的亚甲基蓝染色法和红墨水染色法中,利用红墨水染色法所测定的 3 种泥炭藓孢子未染色率与将其进行烟溶液处理后所得到的萌发率依然存在显著性差异($P<0.05$);而亚甲基蓝染色率与烟溶液处理后的孢子萌发率之间无差异,且高度相关($R^2=0.990$)。另外,使用亚甲基蓝染色法所得染色率高于烟溶液浸泡处理后的孢子萌发率,更高于孢子的初始萌发率(表 2)。



a. 亚甲基蓝染色法; b. 四唑染色法; c. 碘-碘化钾染色法; d. 红墨水染色法。
a. Methylene blue dyeing; b. TTC dyeing; c. I₂-KI dyeing; d. Red ink dyeing.

图 1 4 种泥炭藓孢子染色方法的效果比较 (以毛缘泥炭藓为例)

Fig. 1 Results comparison of four kinds of dyeing methods for *Sphagnum* spores (taking *S. fimbriatum* as an example)

2.4 烟溶液处理对孢子染色的影响

在亚甲基蓝染色法的应用中,3 个物种表现出一致的规律,即经烟溶液处理后再染色所得的染色率显著低于直接染色的染色率($P < 0.05$,图 2),且与萌发率之间存在显著差异($P < 0.05$,表 2 和图 2)。在红墨水法的应用中,经烟溶液处理后再染色所得的未染色率均高于直接红墨水染色的未染色率;除毛缘泥炭藓外,在有无烟溶液处理的不同情况下,同一物种的未染色率之间存在显著差异($P < 0.05$,图 2);与萌发率对比来看,中位泥炭藓和粗叶泥炭藓孢子经烟溶液处理后的未染色率与其萌发率之间无差异(均 $P > 0.05$,表 2 和图 2)。

3 讨论与结论

4 种染色方法中,亚甲基蓝染色法和红墨水染色法具较清晰的染色效果,但亚甲基蓝染色法染

色率与经烟溶液处理后的萌发率最接近,且大于未经烟溶液浸泡处理的孢子初始萌发率。由此反映出,烟溶液可促进孢子萌发,而亚甲基蓝染色率能指示烟溶液浸泡后的孢子萌发率。

在进行 TTC 染色时,依据前人研究结果所选择的染液浓度和浸泡时间对孢子染色并无效果(Mendes et al., 2009; Kaiser et al., 2014)。这与孢子壁阻碍 TTC 进入、孢子脱氢酶含量过低或呼吸代谢不强有关。另外,Kaiser 等(2014)对单花番樱桃(*Eugenia uniflora*)种子进行 TTC 染色时发现,附着在种子上的被膜起到物理屏障的作用,阻止了内部组织与 TTC 溶液的直接接触,且苔藓植物孢子壁具有成层性(Brown et al., 1982)。因此,在使用 TTC 染色时,需使用去角质、破除屏障等方法使种皮具有渗透性(Magrini et al., 2019),即需对孢子进行预处理。

由于泥炭藓孢子中的淀粉含量比较低,利用

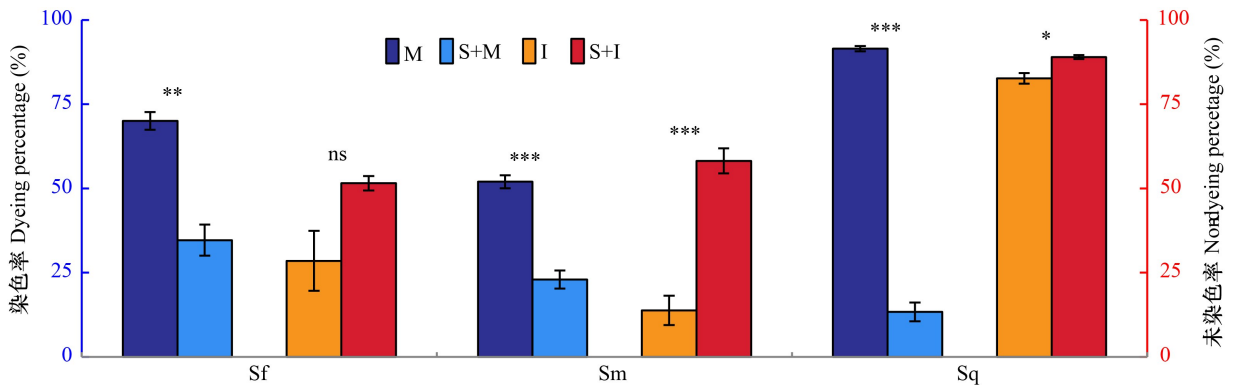
表 2 3 种泥炭藓孢子经 4 种染色方法的染色率及在两种培养液培养后的萌发率

Table 2 Spore dyeing percentages detected by four methods and spore germination percentages of three *Sphagnum* species spores cultivated with two culture solutions

物种 Species	(未)染色率 Dyeing or non-dyeing percentage (%)				P 值 P value	萌发率 Germination percentage (%)		
	亚甲基蓝染色法 Methylene blue (Dyeing)	四唑 染色法 TTC	碘-碘化钾 染色法 I ₂ -KI	红墨水染色法 Red ink (Non-dyeing)		营养液 Nutrient solution (NS)	营养液+烟溶液 NS + Smoke solution	P 值 P value
	毛缘泥炭藓 <i>S. fimbriatum</i>	70.05±2.64	—	—		28.50±8.89	0.011	56.73±1.97
中位泥炭藓 <i>S. magellanicum</i>	51.97±1.92	—	—	13.78±4.36	0.001	43.18±1.75	49.11±1.03	0.043
粗叶泥炭藓 <i>S. squarrosum</i>	91.50±0.76	—	—	82.67±1.59	0.007	70.17±1.59	88.5±0.87	0.001

注: 数据=平均值±标准差($n=3$); 亚甲基蓝法统计染色率, 红墨水法统计未染色率; “—”表示在显微镜下无法辨别染色效果; 3 种泥炭藓孢子分别进行萌发率与生活力的差异显著性比较。

Note: Value = $\bar{x} \pm s$ ($n=3$); Methylene blue method for statistical dyeing percentage, red ink method for non-dyeing percentage; “—” represents that it is impossible to distinguish the effect of dyeing under the microscope; Differences between spore germination percentage and viability of the three *Sphagnum* species were compared, respectively.



Sf. 毛缘泥炭藓; Sm. 中位泥炭藓; Sq. 粗叶泥炭藓。M. 亚甲基蓝染色; S+M. 烟溶液处理后亚甲基蓝染色; I. 红墨水染色; S+I. 烟溶液处理后红墨水染色。数据=平均值±标准差($n=3$)。ns. 无显著差异; * . $P<0.05$; ** . $P<0.01$; *** . $P<0.001$ 。Sf. *Sphagnum fimbriatum*; Sm. *S. magellanicum*; Sq. *S. squarrosum*. M. Methylene blue dyeing; S+M. Smoke water soaking and then methylene blue dyeing; I. Red ink dyeing; S+I. Smoke water soaking and then red ink dyeing. Value = $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). ns. no significant difference; * . $P<0.05$; ** . $P<0.01$; *** . $P<0.001$.

图 2 有无烟溶液处理后 3 种泥炭藓孢子亚甲基蓝染色率和红墨水未染色率

Fig. 2 Dyeing percentages of three *Sphagnum* species spores with methylene blue dyeing and non-dyeing percentages with red ink after being soaked with or without smoke solution

I₂-KI 并不能使泥炭藓孢子染色。有研究表明, 藓类植物孢子中的脂肪含量很高, 明显高于其他成分 (Fang & Zhu, 2012)。利用红墨水染色法的确可以使孢子着色, 但将未染色率、烟溶液浸泡后的萌发率、孢子初始萌发率相比, 三者都具有显著差异。并且, 利用红墨水染色的孢子颜色深浅不一, 存在较大误差。

孢子的自身代谢老化、环境的温度、水分、埋藏深度、氧、微生物、化感作用、pH 和养分等都会对孢

子的生活力造成影响 (Feng et al., 2018), 使孢子的萌发率低于生活力。一定浓度的烟溶液处理可促进泥炭藓孢子的萌发 (康媛等, 2019), 使烟溶液处理后的孢子萌发率更能表征孢子生活力。本试验中, 亚甲基蓝染色法的染色效果最明显, 染色快速, 无需经过复杂的恒温水浴等操作, 且染色率与烟溶液处理后的萌发率无差异, 表明该方法可以作为泥炭地苔藓植物孢子生活力的快速检测方法。

在本试验的 3 个物种中, 除毛缘泥炭藓外, 由于

经烟溶液处理后再利用红墨水进行染色所得到的未染色率与孢子烟溶液处理后的萌发率无差异,因此烟溶液处理后的生活力测定可以利用此法进行操作。另外,尽管清晰度略低,但测定孢子生活力仍可使用红墨水染色法与亚甲基蓝染色法相互佐证,避免单一测定出现的误差,增加准确度。

经烟溶液处理后使用亚甲基蓝染色所得染色率远低于直接染色的染色率。一方面,烟气中的某些化学成分优先与亚甲基蓝发生反应,从而导致孢子无法显色;另一方面,亚甲基蓝是一种碱性的活体染色剂,能与核酸结合令细胞核呈蓝色,而烟溶液的浸泡可能影响核酸物质,使孢子无法染上色。因此,将此法用于泥炭地地层中经历过野火烟气影响的孢子会低估其生活力。

致谢 范贝贝同学在试验过程中给予了帮助,谨致谢意。

参考文献:

ANISZEWSKI T, HAIKONEN J, HELWIG B, et al., 2012. Vigor, vitality and seed dormancy of *Avena sativa* cultivars in a long-term experiment [J]. *J Appl Bot Food Qual*, 85(2): 150-158.

BROWN RC, LEMMON BE, CAROTHERS ZB, 1982. Spore wall ultrastructure of *Sphagnum lescurii* sull [J]. *Rev Palaeobot Palynol*, 38(1/2): 99-107.

BU ZJ, LI Z, LIU LJ, et al., 2017. Bryophyte spore germinability is inhibited by peatland substrates [J]. *Acta Oecol*, 78(1): 34-40.

DU GC, XU JG, GAO CR, et al., 2018. Effect of low storage temperature on pollen viability of fifteen herbaceous peonies [J]. *Biotechnol Rep*, 20(1): 1-6.

FANG Y, ZHU RL, 2012. *Haplocladium microphyllum* (Hedw.) Broth. capsules as food for *Agrotis* sp. (Lepidoptera) larvae [J]. *J Bryol*, 34(2): 108-113.

FENG L, BU ZJ, MALLIK A, et al., 2017. Continuous waterlogging may not facilitate germinability maintenance of *Sphagnum* spores [J]. *Wetlands*, 37(6): 1015-1022.

FENG L, SEBASTIAN S, OOI MKJ, et al., 2018. Oxygen-deficiency and allelochemicals affect *Sphagnum* spore persistence in peatlands [J]. *Plant Soil*, 432(1/2): 403-413.

HU J, 2009. Principles and method of seed viability test [M]. Beijing: China Agricultural Press. [胡晋, 2009. 种子生活力测定原理和方法 [M]. 北京: 中国农业出版社.]

KAISER DK, BIRON RP, SIMONATO SC, et al., 2014. Adjustment of the methodology of the tetrazolium test for estimating viability of *Eugenia uniflora* L. seeds during storage [J]. *BBA*, 36(3): 344-351.

KANG Y, BAI XS, BU ZJ, et al., 2019. Simulated study on the effects of smoke on *sphagnum* spore germination [J]. *Chin J Appl Ecol*, 30(2): 637-643. [康媛, 白晓珊, 卜兆君, 等, 2019. 烟气对泥炭藓孢子萌发影响的模拟研

究 [J]. *应用生态学报*, 30(2): 637-643.]

KOMBA, CG, BRUNTON BJ, HAMPTON JG, 2006. Accelerated ageing vigour testing of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC) seed [J]. *Seed Sci Technol*, 34(1): 205-208.

LI DZ, YANG XY, PRITCHARD HW, 2011. Strategies and challenges in plant germplasm conservation [J]. *Plant Divers Resour*, 33(1): 11-18. [李德铎, 杨湘云, PRITCHARD HW, 2011. 种质资源保存的战略问题和面临的挑战 [J]. *植物分类与资源学报*, 33(1): 11-18.]

LI F, LI SM, KE WD, et al., 2016. Study on viability and storage life of *Heleocharis dulcis* pollen [J]. *Hubei Agric Sci*, 55(10): 2564-2566. [李峰, 李双梅, 柯卫东, 等, 2016. 荸荠花粉活力测定及贮藏寿命研究 [J]. *湖北农业科学*, 55(10): 2564-2566.]

LI QP, WU SP, LU BB, et al., 2013. A rapid detection method of moss spore viability [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 33(10): 2126-2130. [李秋萍, 吴思苹, 鲁蓓蓓, 等, 2013. 藓类植物孢子生活力的快速检测方法初探 [J]. *西北植物学报*, 33(10): 2126-2130.]

MA Z, LIU J, DONG J, DONG JJ, et al., 2019. Optimized qualitative and quantitative methods for barley viability testing using triphenyl tetrazolium chloride staining [J]. *Cereal Chem*, 96(3): 421-428.

MAGRINI S, BARRECA D, ZUCCONI L, 2019. A rapid double-staining technique to improve seed viability testing in terrestrial orchids [J]. *Plant Biosyst*, 153(6): 877-882.

MANJU V, KUMAR S, 2015. Seed leachate conductivity and its correlation with the seed viability and germination of TNAU papaya cv. CO8 seeds stored under different environmental conditions [J]. *Inter J Agric Sci Res*, 5(4): 127-130.

MENDES AMS, BASTOS AA, MELO MGG, 2009. Padronização do teste de tetrazólio em sementes de *Parkia velutina* Benoist (Leguminosae - Mimosoideae) [J]. *Acta Amazon*, 39(4): 823-828.

SU YY, WANG KC, XUE Q, 2016. Study of the pollen viability and stigma receptivity of *Agastache rugosa* from different areas [J]. *Acta Pratac Sin*, 25(9): 189-196. [苏芸芸, 王康才, 薛启, 2016. 不同产地藿香花粉活力与柱头可授性研究 [J]. *草业学报*, 5(9): 189-196.]

WU ZJ, ZHU ZB, GUO QS, et al., 2012. Preliminary study on pollination biology of *Tulipa edulis* [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 37(3): 293-297. [吴正军, 朱再标, 郭巧生, 等, 2012. 老鸦瓣传粉生物学初步研究 [J]. *中国中药杂志*, 37(3): 293-297.]

YANG FJ, ZHANG Y, ZHANG J, et al., 2010. Research on the determining methods of the pollen viability and stigmatic receptivity of *Saposhnikovia divaricata* [J]. *Ginseng Res*, 22(2): 22-25. [杨发君, 张妍, 张建, 等, 2010. 防风花粉活力测定方法的比较及柱头可授性的研究 [J]. *人参研究*, 22(2): 22-25.]

ZHANG ZL, QU WJ, 2003. Experimental guidance of plant physiology [M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press: 206. [张志良, 瞿伟菁, 2003. 植物生理学实验指导 [M]. 3版. 北京: 高等教育出版社: 206.]

ZHAO XG, GAO YY, WANG X, et al., 2016. Research on tomato seed vigor based on X-ray digital image [C]. *Optoelectronic Imaging & Multimedia Technology IV*. Beijing: International Society for Optics and Photonics.