

宋常美,文晓鹏,李庆宏.红枫湖樱桃花粉超低温保存探究[J].江苏农业科学,2018,46(5):117-120.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.05.031

红枫湖樱桃花粉超低温保存探究

宋常美¹,文晓鹏²,李庆宏³

(1. 贵阳学院生物与环境工程学院,贵州贵阳 550003; 2. 贵州大学农业生物工程重点实验室,贵州贵阳 550025;

3. 贵阳市农业试验中心,贵州贵阳 550003)

摘要:探讨了红枫湖樱桃花粉的长期保存条件。结果显示,室温下干燥 3 h 的花粉 -196 ℃ 保存萌芽率最高 (85.71%),随后急剧下降,12 h 时仅 54.65%。而 -196、-80、-20 ℃ 下保存时,4 ℃ 下干燥时间延长并未导致萌发率急剧下降,均在 85% 左右。-80 ℃ 及 -20 ℃ 保存过程中将花粉取出进行干燥会引起萌发率急剧下降,-20 ℃ 下每周干燥 6 h,4 周后萌发率仅 52.06%。活力检测采用离体萌发法和授粉法,-80 ℃ 及 -20 ℃ 保存 1 年后的花粉授粉坐果率与新鲜花粉无显著差异。

关键词:樱桃;花粉;超低温保存;授粉;干燥;时间;温度;保存;萌发率;坐果率

中图分类号: S662.503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)05-0117-03

花粉保存是育种工作的核心内容,适宜的保存方式能延长花粉活力,利于进行异地授粉,克服花期不育等困难,进行杂交种子生产及保持单倍体基因,可有效地推动育种工作的开展,为资源创新提供有力保障。温度和湿度是影响花粉贮藏的重要因素。低温和干燥的环境下,代谢过程减弱且呼吸作用降低,能较长时间保持花粉活力,随贮藏时间的延长,花粉贮藏物质消耗过多,酶活性下降,水分过度缺乏,从而使活力下降^[1-2]。低温保存可适当延长花粉寿命,但活力仍会下降,超低温可长时间保持花粉活力并避免病虫害引入,且便于资源交换^[3-4]。目前,凤梨^[5]、柑橘^[6]、唐菖蒲^[7]、椰子^[8]、桃^[9]和橄榄^[10]等植物花粉均已成功保存。而有关樱桃,尤其是中国樱桃花粉超低温保存却未见报道。

贵州省是樱亚属植物起源中心之一^[11],种质资源丰富,具有遗传改良物质基础。近些年,该省大力发展果蔬产业,樱桃被列为精品水果得以大面积发展,并引种甜樱桃,为利用其耐储存的特点,望将地方资源与其进行杂交能创造耐储存、品质优良且适合在西南大面积栽种的品种。然而,甜樱桃的花期较地方樱桃晚 1 个月,因此进行地方樱桃花粉长期保存研究具有一定的意义。红枫湖樱桃 (*Prunus pseudocerasu* L. 'Hongfenghu') 是贵阳市本土种质资源,果实较大,可作为育种材料,本试验期望通过建立其花粉长期保存体系,为中国樱桃花粉长期保存提供理论参考,最终服务于育种工作。

1 材料与方法

1.1 材料

2011 年 2 月底从贵阳市乌当区摘取即将开放的红枫湖樱桃花,随后将花药用镊子夹落在硫酸纸上自然阴干 1 d,随后连同花药一起进行干燥处理。

收稿日期:2016-09-19

基金项目:贵州省自然科学基金(编号:黔科合 J 字[2015]2007 号);贵州省自然科学基金联合基金(编号:黔科合 J 字 LKG[2013]17 号)。

作者简介:宋常美(1981—),女,贵州遵义人,博士,副教授,主要从事植物生物技术研究。E-mail:gzgyscm@126.com。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 本试验设置了液氮(-196 ℃)、-80 ℃ 及 -20 ℃ 3 种温度保存樱桃花粉。液氮保存即超低温保存,将花粉置于含硅胶的干燥器中,常温和 4 ℃ 下干燥 0、3、6、9、12 h 后收集于冻存管并迅速置入液氮,1 h 后用流水解冻 10 min 进行萌发率检测。-80 ℃ 及 -20 ℃ 保存时将花粉置于含硅胶的干燥器,4 ℃ 下处理 0、3、6、9、12 h 后收集于冻存管,用锡箔纸包裹后放入试管盒,盒子用锡箔纸包裹后再用 2 个塑料袋包裹,分置于 -80 ℃ 及 -20 ℃ 保存 12 个月,干燥 3 h 的花粉每月检测 1 次活力,其余保存 6 个月后检测 1 次。此外,将 -80 ℃ 及 -20 ℃ 下保存 3 月后花粉取出置于含硅胶的干燥器,室温下干燥 0、3、6 h/周,连续处理 4 周,检测保存过程中干燥时间对花粉活力的影响。每个处理含 3 支冻存管,即 3 个重复。

1.2.2 花粉活力检测 花粉活力检测采用离体萌发法和坐果率检测。离体萌发法检测操作如下:取适量培养基(0.1 g/L 硼酸+10% 蔗糖+0.5% 琼脂)在载玻片上,待凝固后用医用棉签蘸少量花粉均匀抖落在上面,随后放入垫有湿滤纸的培养皿,用保鲜膜封皿后置于恒温培养箱中培养,培养温度为 25±2 ℃,8 h 后统计数据。所有处理均含 3 个重复,每个重复培养 3 个载玻片,每个载玻片选 3 个视野计数,每个视野花粉数多于 50 粒。坐果率检测时将 -80 ℃ 及 -20 ℃ 下保存 12 个月的花粉进行同株授粉,同时采用当年花粉为对照,授粉时将处于铃铛期或棉花期的花朵进行连被去雄,30 d 后统计坐果率。

1.3 数据统计分析

数据均采用 SPSS 17.0 软件分析,萌发率=萌发花粉数/花粉总数×100%(花粉管长度超过花粉粒直径作为萌发标准),坐果率=坐果数/授粉总数×100%。

2 结果与分析

2.1 干燥温度及时间对超低温保存的影响

干燥温度对花粉超低温保存的萌发率有明显影响(图

1)。2 种温度下干燥 3 h 的花粉萌发率明显高于未干燥的花粉,未干燥花粉萌发率仅 63.55%,而干燥后的花粉可达到 83% 以上。室温下随干燥时间的延长萌发率逐渐下降,12 h 降至最低(54.65%),15 h 略有回升(62.57%)。然而,4℃ 下干燥的花粉萌芽率在 3 h 后并未随时间延长而降低。因此,为避免花粉活力下降,室温干燥时间以约 3 h 为宜,4℃ 下的干燥时间没有明显影响。

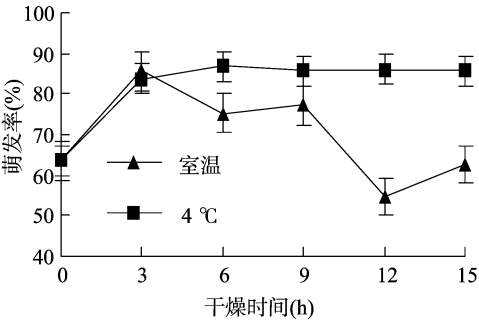


图1 干燥时间及温度对超低温保存的影响

2.2 干燥时间及保存温度的影响

将干燥不同时间的花粉在 -20℃ 及 -80℃ 下保存 6 个月后进行活力检测,发现干燥时间无明显影响,萌发率为 85%~86% (图 2)。从图 3 可以看出,保存温度也无明显影响,-20℃ 及 -80℃ 下保存的花粉萌发率无明显差异,且保存 10 个月前几乎无变化,随后略有下降。保存 1 个月检测的花粉活力约为 86%,12 个月下降至约 84%。因此,考虑技术及成本,-20℃ 下适合樱花花粉较长时间保存。

2.3 保存中干燥时间的影响

为避免花粉湿度高导致萌发率下降,因此设计在保存过程中对花粉抽出进行干燥 0、3、6 h/周,但发现干燥反而引起

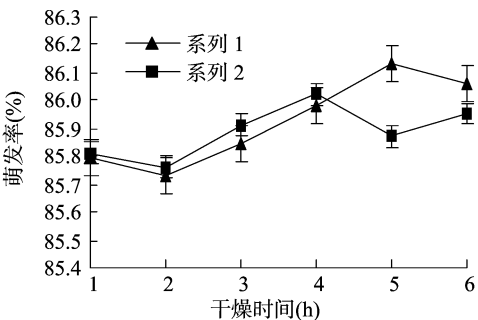


图2 干燥时间对-20℃和-80℃保存的影响

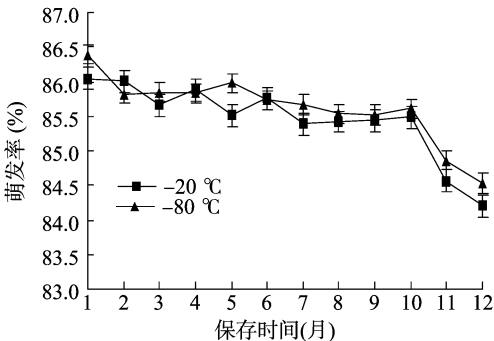


图3 保存时间对-20℃和-80℃保存的影响

萌发率下降(表 1)。-20℃ 及 -80℃ 下,花粉活力均随干燥时间的延长而下降。-20℃ 下,不干燥萌芽率可一直保持 85% 以上,但 4 周后,干燥 3 h 和 6 h 的萌发率分别为 67.61% 和 52.06%。-80℃ 下,不干燥萌芽率亦可一直保持 85% 以上,4 周后干燥 3 h 和 6 h 的萌发率分别为 61.93% 和 52.52%。

表 1 保存中干燥时间对花粉萌发率的影响

干燥周次	保存温度 -20℃			保存温度 -80℃		
	干燥 0 h	干燥 3 h	干燥 6 h	干燥 0 h	干燥 3 h	干燥 6 h
1	85.88 ± 7.01a	80.66 ± 3.09b	78.31 ± 4.53b	86.23 ± 2.68a	79.51 ± 3.49b	75.64 ± 2.88c
2	85.78 ± 3.37a	77.80 ± 3.53b	72.84 ± 2.93c	86.11 ± 3.01a	70.80 ± 3.15b	68.31 ± 3.88c
3	85.36 ± 3.05a	72.42 ± 6.20b	63.37 ± 4.76c	85.88 ± 2.34a	67.18 ± 2.40b	61.20 ± 2.35c
4	85.0 ± 2.70a	67.61 ± 4.92b	52.06 ± 2.80c	85.83 ± 5.83a	61.93 ± 2.56b	52.52 ± 1.90c

注:同列数据后相同字母表示经邓肯氏多重极差检验在 0.05 水平上差异不显著。表 2 同。

2.4 坐果率检测

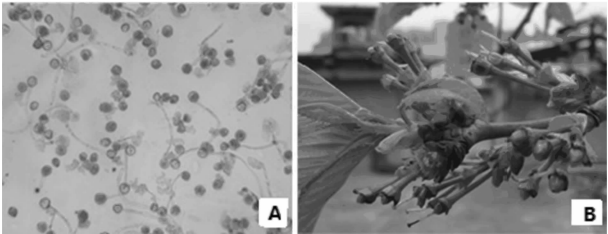
-20℃ 及 -80℃ 下保存 1 年后的花粉与 CK 无显著差异(表 2、图 4),保存的花粉授粉坐果率均可达到 80% 左右,但三者数值以 -80℃ 最高(87.17%),其次为 CK(84.75%)、-20℃(78.68%)。由此可见,-20℃ 及 -80℃ 下保存 1 年后的花粉可用于授粉。

表 2 保存温度对坐果率的影响

温度 (℃)	授粉数 (粒)	膨大数 (粒)	坐果率 (%)
-20	101	77	78.68 ± 11.85a
-80	109	92	87.17 ± 11.55a
CK	114	93	84.75 ± 12.37a

3 讨论

Towill 认为超低温保存效果取决于花粉的干燥度,适宜



A.花粉萌发 B.授粉
图4 花粉萌发及授粉

的干燥方式和干燥时间对花粉储藏有较大影响^[12]。许多植物用硅胶干燥 4 h 为好^[13-15]。Barnabas 认为含水量对花粉的超低温保存影响很大,但过分干燥不行^[16-17]。干燥后的辣椒花粉进行超低温(-196℃)贮藏 1 年仍具有新鲜花粉一半活力,但未干燥几乎无有效储藏期^[18]。本试验对干燥温度和时间进行了探讨,发现室温干燥 3 h 后可获得较高萌发率,干燥

时间过长则萌发率下降,12 h 后急剧下降。然而,本试验在 -196°C 、 -20°C 和 -80°C 下保存时均发现, 4°C 下干燥时间长短无影响,且试验中还发现部分花粉受潮成团的现象。本试验同时发现,将保存在 -20°C 和 -80°C 下的花粉取出,于室温干燥 0、3、6 h 后获得的结果不一样,干燥 3 h 或 6 h 花粉活力下降,尤其以 6 h 下降更快。这也许说明干燥时的温度对花粉保存的影响大于含水量。究其原因,可能有 3 点:一是花粉在 4°C 干燥时已经历低温锻炼,同时在放入 -20°C 和 -80°C 时具有多层包裹物,一定程度上降低了低温的刺激,从而更利于适应环境变化。陶丽等在 4°C 、 25°C 及 -80°C 下储藏澳洲坚果花粉,发现 -80°C 最差,认为与保存前未干燥处理有关,这也说明干燥时的低温锻炼对花粉活力有一定影响^[19]。二是室温干燥时温度较高,花粉失活较快。杨帆等采用自然干燥、干燥皿干燥、 40°C 烘箱干燥 3 种方式干燥澳洲坚果花粉,并在 4°C 保存,结果表明前 2 种方式下花粉萌发率极显著高于后者^[20]。三是花粉经历反复的解冻和冷冻,细胞易受伤害导致活力下降。这与吕晋慧等在地被菊花花粉保存上的观点^[21]一致。综上,本试验认为,樱花花粉干燥时的温度比含水量的影响更大,低温干燥可避免花粉活力在储存前快速下降。

花粉是否具有活力最有利的证据为是否能授粉,某些花粉经低温保存后,出现离体萌发率低而授粉能力强的现象^[22]。这种现象可能是因为低温保存后的花粉对萌发培养基不敏感^[23-24],保存后的花粉萌发率达到 10% ~ 30% 就能授粉坐果^[25-26]。本试验中,储存于 -20°C 和 -80°C 下的花粉萌发率均在 85% 左右,授粉率与新鲜花粉相比无显著差异,甚至数值上 -80°C 储藏花粉高于新鲜花粉。矮牡丹经超低温保存后出现花粉萌发率明显升高的“冷刺激”现象^[1]。魔芋^[27]和山龙眼属^[28]花粉超低温保存中均发现此现象,但该现象出现的机制目前尚不清楚。玫瑰花粉经液氮超低温保存后的授粉能力与新鲜花粉也没有区别^[29]。Parton 等将保存于 -80°C 下 6 个月的蜻蜓凤梨花粉进行授粉,授粉能力并未下降,而虎纹凤梨却被发现其授粉能力不如新鲜花粉^[30]。飞燕草花粉储存在 25°C 下 60 d 便没有授粉能力,而 -30°C 下 180 d 后授粉能力高于新鲜花粉^[31]。总体而言, -20°C 便可进行樱花花粉长期保存。

本试验储藏花粉是同花药一起保存的,与仅保存花粉的方法有差异,但也获得了较好的效果,这样使得操作更简便,且提高花粉利用率。这种方法在杜鹃红山茶花^[32]和桂花^[33]上亦用到。

参考文献:

- [1] 贾文庆, 张少伟, 刘露颖, 等. 不同培养基和贮藏方法对矮牡丹花粉萌发的影响[J]. 西南农业学报, 2013, 26(1): 338-341.
- [2] 韩成刚, 盖树鹏. 不同条件下芍药花粉的贮藏寿命[J]. 种子, 2012, 31(3): 87-89.
- [3] 胡晋, 郭长根. 超低温 (-196°C) 保存杂交水稻恢复系划分的研究[J]. 作物学报, 1996, 22(1): 72-77.
- [4] 殷晓辉, 舒理慧. 植物种质资源的超低温保存研究进展[J]. 热带亚热带植物学报, 1996, 4(3): 75-82.
- [5] Parton E, Vervaeke I, Delen R, et al. Viability and storage of bromeliad pollen[J]. Euphytica, 2002, 125(2): 155-161.
- [6] Kundu M, Dubey A, Srivastav M, et al. Effect of gamma ray irradiation and cryopreservation on pollen stainability, *in vitro* germination, and fruit set in *Citrus* [J]. Turkish Journal of Biology, 2014, 9(38): 1-9.
- [7] Geng X M, Qiu J Y, Okubo H S. Changes of carbohydrate content during *Lilium* and *Gladiolus* pollen cryopreservation [J]. Grana, 2013, 52(3): 202-206.
- [8] Machado C D A, Moura C R F, Lemos E E P D, et al. Pollen grain viability of coconut accessions at low temperatures [J]. Acta Scientiarum Agronomy, 2014, 36(2): 227-232.
- [9] 宋常美, 李庆宏. 艳红桃花粉离体萌发及超低温保存探究[J]. 种子, 2015, 34(11): 91-93, 99.
- [10] Alba V, Bisignano V, Alba E, et al. Effects of cryopreservation on germinability of olive (*Olea europaea* L.) pollen [J]. Genet Resour Crop Evol, 2011(58): 977-982.
- [11] 曹东伟. 李属樱亚属植物分子亲缘地理学研究[D]. 西安: 西北大学, 2006.
- [12] Towill L E. Low temperature and freeze -/vacuum - drying preservation of pollen [M]//Cryopreservation of plant cells and organs. Boca Raton: CRC Press, 1985.
- [13] Yates I E, Sparks D. Hydration and temperature influence *in vitro* germination of pecan pollen [J]. J Amer Soc Hort Sci, 1989, 114(4): 599-605.
- [14] Parton E, Vervaeke I, Delen R, et al. Viability and storage of bromeliad pollen [J]. Euphytica, 2002, 125(2): 155-161.
- [15] Hughes H G, Lee C W. Low temperature preservation of *Clanthus formosus* pollen [J]. Hortscience, 1991, 26(11): 1411-1412.
- [16] Barnabas B. Freeze preservation of pollen [J]. Les Colloques de l'INRA, 1983(21): 429-433.
- [17] Barnabas B, Rajki E. Storage of maize (*Zea mays* L.) pollen at -196°C in liquid nitrogen [J]. Euphytica, 1976, 25(1): 747-752.
- [18] 张保才, 李晓丹, 崔鸿文, 等. 不同贮藏方式对辣椒花粉生活力及授粉效果的影响[J]. 西北农业学报, 2013, 22(7): 132-137.
- [19] 陶丽, 倪书邦, 贺照勇, 等. 不同贮藏方式对澳洲坚果花粉萌发率的影响[J]. 中国南方果树, 2010, 39(3): 52-54.
- [20] 杨帆, 陶丽, 陈丽兰, 等. 澳洲坚果花粉保存及生活力测定 [J]. 中国农学通报, 2014, 30(13): 126-130.
- [21] 吕晋慧, 赵耀, 王媛, 等. 地被菊花花粉活力和储藏性研究 [J]. 园艺学报, 2012, 39(12): 2483-2490.
- [22] Honda K, Watanabe H, Tsutsui K. Cryopreservation of Delphinium pollen at -30°C [J]. Euphytica, 2002, 126(3): 315-320.
- [23] Stanley R G, Linskens H F. Pollen: biology, biochemistry and management [M]. New York: Springer Berlin Heidelberg, 1974.
- [24] Shivanna K R, Johri B M. The Angiosperm pollen: Structure and function [M]. New Delhi, India: Wiley Eastern Ltd., 1985.
- [25] Nath J, Anderson J O. Effect of freezing and freeze - drying on the viability and storage of *Lilium longiflora* and *Zea mays* L. pollen [J]. Cryobiology, 1975, 12(1): 81-88.
- [26] Layne R E C, Hagedorn D J. Effect of vacuum - drying, freeze - drying and storage environment on the viability of pea pollen [J]. Crop Science, 1963, 3(5): 433-436.
- [27] 张玉进, 张兴国, 刘佩瑛. 魔芋花粉的低温和超低温保存 [J]. 园艺学报, 2000, 27(2): 139-140.
- [28] Van Der Walt I D, Littlejohn G M. Storage and viability testing of protea pollen [J]. J Amer Soc Hort Sci, 1996, 121(5): 804-809.
- [29] Marchant R, Power J B, Davey M R, et al. Cryopreservation of pollen

徐丽萍,喻方圆. 东京野茉莉花芽发育过程中的生理特性[J]. 江苏农业科学,2018,46(5):120-123.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.05.032

东京野茉莉花芽发育过程中的生理特性

徐丽萍^{1,2}, 喻方圆²

(1. 南通理工学院, 江苏南通 226001; 2. 南京林业大学林学院/南方现代林业协同创新中心, 江苏南京 210037)

摘要:对东京野茉莉花芽发育期间的生理特性进行了研究。研究结果,花芽发育期间,叶片内可溶性糖含量、有机碳含量变化不大,而淀粉、蛋白质、磷、钾含量总体下降,镁含量逐渐增加,ABA/GA₃ 比值明显高于 ABA/IAA、IAA/ZR、ABA/ZR 的比值,有利于花芽的分化。

关键词:东京野茉莉;内源激素;营养物质;花芽发育

中图分类号:S685.160.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)05-0120-04

东京野茉莉(*Styrax tonkinensis*)又名越南安息香、白花树等,属于安息香科安息香属,用途甚广。近年来,众多学者对该树种开展了研究,主要研究了花色^[1]和花香的成分^[2]、树脂成分^[3]、苗木生长^[4]、木材特性^[5]等,但是对于其花芽发育过程中的生理生化变化的资料不多。为了解东京野茉莉花芽发育规律,以便进一步调控其开花质量、数量以及确定采收期,本试验以4年生东京野茉莉为对象,研究花芽发育过程中的植物体内复杂的生理变化,以期明确东京野茉莉花芽发育进程和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为东京野茉莉,采自江苏国杏生物科技有限公司育苗基地,该基地位于南京市六合区马集镇河王坝水库边。母树4年生,已开始进入结实期。采样树高3~5 m,冠幅1~2 m,列植,长势良好。测定生理变化的样品从2013年4月12日开始,第1次取样,取花芽附近的叶片,以后每隔4 d取1次样品,直到5月14日第1朵花开放,共取9次样品。样品取完放在超低温冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 营养物质含量的测定 可溶性糖和淀粉含量,参照蒽酮比色法测定^[6];可溶性蛋白质含量,采用考马斯亮蓝 G250

比色法^[6]。以上3种物质含量的测定都是在 Du800 Beckman 紫外分光光度计上完成。

1.2.2 大量元素碳(C)、氮(N)、磷(P)、钾(K)、镁(Mg)、钙(Ca)的含量测定 总碳含量测定,采用重铬酸钾氧化-外加热法^[7];K、Mg、Ca、N、P 矿质元素的测定,样品制备称取0.1~0.5 g 烘干的样品于试管中先加9 mL 浓硫酸,再加1 mL 高氯酸,摇晃,然后高温消煮,直至溶液澄清,过滤定容100 mL。进行K、Mg、Ca 元素的含量测定时,吸取上述提取液1 mL,水稀释10倍,在原子火焰吸收分光光度计 Unicam 969 AA Spectrometer 上测定。进行N、P 元素的含量测定时,采用酸消解总凯氮、磷测定,吸取上述提取液1 mL,4% 稀硫酸稀释2倍,在 AutoAnalyzer 3 High Resolution Digital Colorimeter 上测定。其中:C/N 为有机碳含量/氮含量。

1.2.3 内源激素含量的测定 采用酶联免疫吸附法(ELISA)^[8]测定内源激素含量。结果计算参照 Weiler 等的方法^[9-10]。

2 结果与分析

2.1 花芽发育过程中营养物质含量变化

2.1.1 可溶性糖淀粉含量 东京野茉莉在3—4月是花芽分化阶段,4—5月是花芽形态发育阶段,这期间叶片进一步长大成熟并行使自己的生理功能,其体内营养物质含量发生了复杂的变化。可溶性糖是植物直接利用和运输的养分主要形式,淀粉可作为能源物质,这些碳水化合物与花芽的生长发育有着密切的关系。从图1可以看出,可溶性糖随着叶片光合作用增强含量逐渐上升,4月20日升至最大值,然后随之下降,4月24日降至低谷;随后逐渐上升保持一个平稳的趋势,5月10日有所下降,然后临近开花含量又上升。从4月至5月,可溶性糖含量有波动,但变化不大,说明植物体中可溶性糖含量保持相对稳定,可为植物提供良好的碳素营养来

收稿日期:2016-10-23

基金项目:江苏省高等教育优势学科建设项目(编号:PAPD);江苏省农业三新工程(编号:SZX2014S0020)。

作者简介:徐丽萍(1970—),女,江苏南通人,博士,副教授,主要从事生物教学和植物生理、资源开发与利用研究。E-mail: xuliping70@126.com。

通信作者:喻方圆,博士,教授,主要从事林木种苗的研究。E-mail: fyyu@njfu.com.cn。

from two rose cultivars[J]. Euphytica,1993,66(3):235-241.

[30] Parton E, Vervaeke I, Delen R, et al. Viability and storage of bromeliad pollen[J]. Euphytica,2002,125(2):155-161.

[31] Honda K, Watanabe H, Tsutsui K. Cryopreservation of *Delphinium* pollen at -30 °C[J]. Euphytica,2002,126(3):315-320.

[32] 刘玉玲,潘文,张方秋,等. 杜鹃红山茶花粉保存及其生活力测定[J]. 广东林业科技,2010,26(2):1-6.

[33] 张洪伟,段一凡,李稚,等. 不同贮藏方法对桂花花粉活力影响的研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2014,38(增刊1):7-12.