田　敏,杨　晓,王继华,等. 几种切花菊的花粉超低温保存[J]. 江苏农业科学,2018,46(20):142 – 145.
doi:10.15889/j.issn.1002 – 1302.2018.20.036

几种切花菊的花粉超低温保存

田　敏[1], 杨　晓[2], 王继华[1], 顾强键[2], 莫锡君[1]
(1. 云南省农业科学院花卉研究所/云南省花卉育种重点实验室/国家观赏园艺工程技术研究中心,云南昆明 650200;
2. 云南丰岛花卉有限公司,云南富民 650400)

摘要:对 8 个切花菊品种进行花粉超低温保存,并比较其超低温保存前后的花粉活力和杂交结实率。结果发现,4 个切花菊品种 Amedia、Menalisa Pink、CA – 154、CA – 249 的花粉超低温保存后的花粉活力没有显著变化,3 个切花菊品种 Lisbon、Florange、CA – 7 的花粉超低温保存后的花粉活力显著降低,1 个切花菊品种 CA – 308 的花粉超低温保存后的活力显著升高。将超低温保存的切花菊品种 Lisbon 和 CA – 7 的花粉用于田间育种,保存了 1 个月和 1 年后的花粉结实率和新鲜花粉相比没有显著变化。Lisbon 和 Florange 这 2 个品种的花粉超低温保存后存在多重花粉管现象,但不能判定超低温保存是引起此现象的因素。说明超低温保存技术用于切花菊花粉的保存和杂交育种是有效的。

关键词:切花菊;超低温保存;花粉萌发;花粉活力;结实率;多重花粉管;杂交育种
中图分类号: S682.1⁺10.36　　**文献标志码**: A　　**文章编号**:1002 – 1302(2018)20 – 0142 – 04

菊花(*Chrysanthemum* × *morifolium* Ramat.)为菊科(Asteracceae)菊属植物,是菊属植物及由其变异、杂交形成的栽培品种的统称[1]。菊花是中国传统十大名花之一,具有丰富的文化内涵[2],也是世界四大切花之一,在世界花卉产业中的产量和产值均居于前列[3]。杂交育种是培育菊花新品种最主要的途径[4],但菊科植物的花粉属于短寿命的三核型花粉,这种类型的花粉外壁较薄,对外界不良条件抵抗力较差,保存困难[5]。4、– 20、– 80 ℃条件保存后,菊花花粉生活力明显降低,保存期不超过 1 个月[6-7]。超低温保存(cryopreservation)技术能实现花粉的长期保存,已成功应用于许多植物[8]。超低温保存是指在液氮 – 196 ℃或液氮蒸汽中保存生物材料,如细胞、组织、器官或者其他生物体的方法和技术。在液氮温度下,细胞中所有的生物化学反应包括细胞的程序死亡都被暂时停止,从而使细胞在理论上可以进行无限期的保存[9]。花粉超低温保存技术可以在不破坏种质资源的前提下,最大限度地保存植物的种质资源[10]。因此,花粉也是最早被保存的植物种质[11]。通过超低温保存花粉,可以解决杂交时花期不遇和地理隔离的问题,也可免去每年种植同一父本材料、取材时间受季节限制的问题,且花粉具有

收稿日期:2017 – 05 – 16
基金项目:云南省花卉育种重点实验室开放基金(编号:FKL – 201203);云南省专家基层科研工作站(富民县/云南丰岛花卉有限公司)项目;云南省昆明市菊花工程技术研究中心项目(编号:2015 – 2 – A – 01864)。
作者简介:田　敏(1985—),女,云南开远人,硕士,助理研究员,主要从事花卉遗传育种研究。E – mail:tminfl@yeah.net。
通信作者:莫锡君,研究员,主要从事花卉育种研究。E – mail:moxj427@163.com。

[5]周政贤. 中国马尾松[M]. 北京:中国林业出版社,2001.
[6]丁贵杰. 贵州马尾松人工建筑材林合理采伐年龄研究[J]. 林业科学,1998,34(3):40 – 46.
[7]丁贵杰,吴协保,齐新民,等. 马尾松纸浆材林经营模型系统及优化栽培模式研究[J]. 林业科学,2002,38(5):7 – 13.
[8]谌红辉,丁贵杰. 马尾松造林密度效应研究[J]. 林业科学,2004,40(1):92 – 98.
[9]蔡　琼,丁贵杰. 黔中地区连栽马尾松对土壤微生物的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2006,30(3):131 – 133.
[10]何佩云,谌红辉. 连栽马尾松林根际与非根际土壤养分及酶活性研究[J]. 浙江林业科技,2011,31(1):39 – 43.
[11]何佩云,丁贵杰,谌红辉. 连栽马尾松人工林土壤肥力比较研究[J]. 林业科学研究,2011,24(3):357 – 362.
[12]何佩云,丁贵杰,谌红辉. 第 1 代和第 2 代马尾松林土壤微生物及生化作用比较[J]. 浙江农林大学学报,2012,29(5):703 – 709.
[13]邱贵云. 闽北不同立地条件 20 年生杉木人工林单株生物量的研究[J]. 福建林业科技,1999,26(3):21 – 23.
[14]丁贵杰. 马尾松人工林生物量及生产力的变化规律:Ⅲ不同立地生物量及生产力变化[J]. 山地农业生物学报,2000,19(6):411 – 417.
[15]丁贵杰,王鹏程. 马尾松人工林生物量及生产力变化规律研究Ⅱ. 不同林龄生物量及生产力[J]. 林业科学研究,2002,15(1):54 – 60.
[16]王明君,韩国栋,赵萌莉,等. 样带法在测定草地植物群落最小面积中的应用[J]. 东北农业大学学报,2010,41(6):98 – 104.
[17]潘瑞炽. 植物生理学[M]. 7 版. 北京:高等教育出版社,2012.
[18]刘　茜. 不同龄组马尾松人工林生物量及生产力的研究[J]. 中南林学院学报,1996,16(4):47 – 511.
[19]徐高福,徐高翔,徐高建,等. 不同年龄柏木人工林生物量研究[J]. 林业科技开发,1998(3):35 – 361.
[20]何佩云,丁贵杰,谌红辉. 1、2 代马尾松人工林林分生长特性比较[J]. 辽宁林业科技,2012(1):4 – 8.
[21]何佩云,丁贵杰,谌红辉. 一二代不同林龄马尾松林分材积生长过程及林分结构比较[J]. 江苏农业科学,2012,40(6):146 – 149.

体量小、运输方便、可即时使用的特点，这对远缘杂交育种来说，其贡献是非常大的[12]。一般成熟花粉具有高度的脱水耐受性，在完成脱水过程以后不须要经过特殊处理即可放入液氮进行超低温保存，解冻时只须将其从液氮中取出在常温下放置 2 h 左右即可用于试验或者授粉[8]，非常便利。我国目前进行花粉超低温保存的花卉有梅花[13-14]、山茶[15]、白掌[16]、芍药[17]、牡丹[18-19]、紫花鸢尾[20]、榆叶梅和海棠[21]，其中只有梅花建立了超低温花粉库[22]。

切花菊远缘杂交首先要解决的就是时空隔离问题，表现为花期不遇和地理隔离：切花菊一般都属于秋菊类，自然花期通常为 7—11 月，而须要与其杂交的亚菊属、匹菊属、蒿属和蓍属等大部分菊属植物的自然花期是 4—6 月，造成花期不遇；另外菊属的近缘属中大部分属为不连续分布，具有明显的分布地域性，如亚菊属分布在中国西北地带、太行菊属局限于中国中部等，从而造成不同属间的地理隔离[23]。花粉保存可使原本花期不遇的远缘杂交亲本能够授粉，也可以储藏并运输花粉使异地的远缘亲本得以杂交，解决时空隔离的障碍。简单和高效的花粉长期保存技术对切花菊的资源保存、杂交育种等相关研究和应用具有重要意义。本研究用超低温保存技术保存了 8 种切花菊的花粉，并用花粉活力检测及在田间育种中验证了其有效性。

1　材料与方法

1.1　材料

收集花粉的 8 个切花菊品种全为多头类型切花菊品种，其中 Amedia、Lisbon、Florange 来自荷兰 Deliflor 公司，Menalisa Pink 来自荷兰 Dekker 公司，CA－154、CA－308、CA－249 和 CA－7 为云南丰岛花卉有限公司的自育品种，这 8 个品种都种植在云南丰岛花卉有限公司的切花菊生产基地。在田间育种试验中，杂交母本为 Rodost，多头切花菊类型，来自荷兰 Deliflor 公司，种植在云南丰岛花卉有限公司的切花菊生产基地。试验时间为 2013 年秋季至 2016 年春季；花粉收集地点、花粉超低温保存及授粉地点为云南丰岛花卉有限公司，花粉活力试验地点为云南省农业科学院花卉研究所。

1.2　试验方法

1.2.1　花粉收集　菊花花序中的两性花即管状花的雄蕊释放花粉，在晴朗天气的 15:00 时许放粉最盛。用干燥毛笔轻刷雄蕊，把花粉小心拨入培养皿中，带回实验室备用。由于菊花头状花序上的管状花从外向内逐轮开放，因此须要连续几天收集花粉。

1.2.2　花粉超低温保存　将须要超低温保存的花粉小心转移到冻存管中，把冻存管放入液氮（LN_2）罐中保存。定期补充液氮，保证花粉一直处于超低温状态。储藏的菊花花粉解冻采用吕晋慧等的方法[6]，从液氮罐中取出装有花粉的冻存管，于 35 ℃解冻 2 min。

1.2.3　切花菊花粉超低温保存前后花粉活力的比较　为验证超低温保存切花菊花粉的有效性，分别测定 8 个切花菊花粉超低温保存前和保存后的花粉活力并进行对比。因花粉离体萌发法更符合实际萌发情况[24]，所以本试验采取花粉离体萌发法进行花粉活力测定。含有硼酸、蔗糖的通用培养基对许多二核花粉萌发效果很好，但对三核花粉的菊科萌发效果很差[25]。因此，菊花花粉萌发参照王四清等的方法[26]，采用改良的 Monnier 培养基（ME3），在 22～25 ℃、相对空气湿度 86% 的恒温箱内培养。每隔 1 h 在显微镜下观察统计 1 次花粉萌发率，直至 2 次统计的萌发率基本相同为止，计算花粉的萌发率。花粉萌发的判定标准为花粉管长度大于或等于花粉粒半径。每个品种设 4 个重复，每个重复随机选取 5 个视野，每个视野 200 粒花粉，每个重复共约 1 000 个花粉粒，取 4 个重复的平均值计算该品种的花粉萌发率。花粉萌发率＝萌发花粉数/总花粉数×100%。

1.2.4　切花菊花粉超低温保存前后杂交结实率的比较　为进一步验证超低温保存切花菊花粉的有效性和超低温保存花粉用于杂交育种的可行性，从超低温保存的 8 个切花菊花粉中随机选择 2 个切花菊品种的花粉，分别测定这 2 个切花菊的新鲜花粉和超低温保存后花粉的授粉结实率并进行对比。分别采用新鲜花粉和超低温保存后的花粉，在云南丰岛花卉有限公司的切花菊生产基地进行授粉试验。根据菊花的开放特点，先将花瓣留 1 cm 左右剪短，露出花心，过 1～2 d 后雌蕊柱头开展成“丫”形时，用毛笔蘸取花粉涂抹柱头，每隔 1 d 后再次授粉 1 次，共进行 3 次。因为菊花自交不亲和[27]和有花瓣隔离，所以可以省掉去雄和套袋程序。每个杂交组合设 3 个重复，每个重复随机选取约 1 000 个小花，授粉后进行小花数量计数，取 3 个重复的平均值计算授粉花朵数。待种子成熟后收集种子，取 3 个重复的平均值计算结实数。结实率＝结实数/总授粉花朵数×100%。

1.3　数据分析

试验所得数据采用 SPSS 软件进行处理分析，$\alpha=0.05$。

2　结果与分析

2.1　切花菊花粉超低温保存前后花粉活力的比较

2013—2014 年共保存 8 个切花菊品种花粉，8 个品种都为多头切花菊类型，超低温保存时间分别为 1 年和 1 个月，采用离体萌发法进行了超低温保存前后的花粉活力测定。结果发现，4 个切花菊品种 Amedia、Menalisa Pink、CA－154、CA－249 的花粉超低温保存后的萌发率相比起超低温保存前没有显著变化；3 个切花菊品种 Lisbon、Florange、CA－7 的花粉超低温保存后的萌发率相比起超低温保存前显著降低，但仍具有活力；1 个切花菊品种 CA－308 花粉超低温保存后的萌发率相比起超低温保存前显著升高（表 1）。因此，在超低温保存后，各品种的花粉都保持了一定的活力，品种的差异是影响其超低温保存后花粉活力的主要因素。

表 1　切花菊花粉超低温保存前后的花粉萌发率

品种名	花粉萌发率（%）		花粉收集年份	在液氮中保存的时间（月）
	保存前	保存后		
Amedia	37.7	36.5	2013	12
Lisbon	30.1*	15.5	2013	12
Florange	41.0*	17.8	2013	12
Menalisa Pink	14.5	15.2	2013	12
CA－154	10.6	10.9	2014	1
CA－308	13.2	17.4*	2014	1
CA－249	18.8	19.3	2014	1
CA－7	29.9*	20.6	2014	1

注：* 表示在 0.05 水平差异显著。下同。

2.2　切花菊花粉超低温保存前后杂交结实率的比较

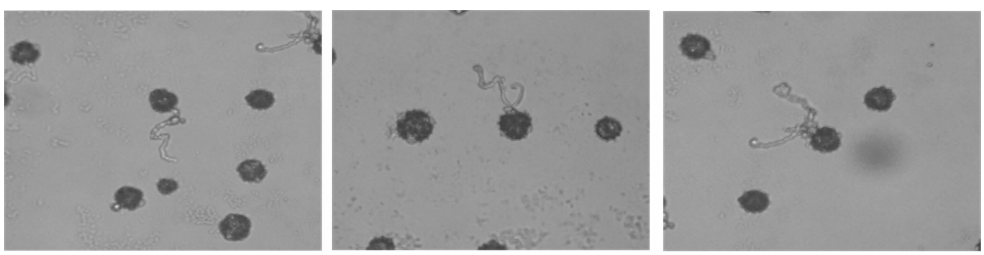
为进一步验证超低温保存切花菊花粉的有效性和超低温保存花粉用于杂交育种的可行性,从超低温保存的 8 个切花菊花粉中随机选择 2 个切花菊品种的花粉进行田间杂交试验,超低温保存时间为 1 个月和 1 年。选取的超低温保存花粉(父本)为 Lisbon(花朵红色)和 CA－7(花朵黄色),杂交母本都为 Rodost(花朵白色),父母本都为多头切花菊类型。在 2014、2015 年秋季分别进行田间授粉,于次年统计结实率(表 2)。结果发现,以 Lisbon 为父本的杂交中,保存了 1 个月的花粉结实率和新鲜花粉相比显著升高,保存 1 年后的花粉结实率和新鲜花粉相比没有显著变化;以 CA－7 为父本的杂交中,保存了 1 个月和 1 年后的花粉结实率和新鲜花粉相比没有显著变化。说明超低温保存技术用于切花菊花粉的保存和田间杂交是有效的。切花菊授粉每隔 1 d 授粉 1 次,共进行 3 次,因此超低温保存后花粉的萌发率和用其授粉后的结实率没有直接相关性。另外,由于所用杂交父母本都为多头切花菊,头状花序高度瓣化,花朵较小即种子非常细小;而且结实率测定周期长(从授粉到收获种子 100～110 d),易受不同母本植株、授粉当年冬季气候环境的影响[28],导致结实数和结实率的统计难免不太准确,该数值只能作为参考。后续继续用其他超低温保存品种的花粉进行田间杂交试验都有结实,证实花粉超低温保存技术可用于切花菊花粉的长期保存和杂交育种。

表 2　超低温保存的切花菊花粉授粉后的结实率

父本品种	在液氮中保存的时间(月)	授粉年份	授粉花朵数(朵)	结实数(个)	结实率(%)
Lisbon	0	2014	930	332	35.7
	1	2014	700	310	44.3*
	12	2014	780	289	37.0
CA－7	0	2015	910	183	20.1
	1	2015	930	160	17.2
	12	2015	960	194	20.2

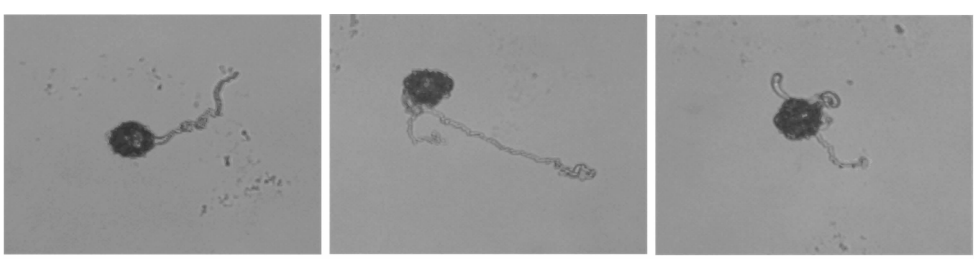
2.3　多重花粉管现象

在 8 个切花菊品种花粉超低温保存后的离体萌发试验中,Lisbon(图 1)和 Florange(图 2)2 个品种的花粉萌发存在多重花粉管现象,主要为二重花粉管和三重花粉管,这可能与花粉粒储藏的营养物质含量有关[29]。通常情况下,花粉只有 1 个萌发孔、1 条花粉管,但偶尔会有多重花粉管现象,即在花粉粒上不止 1 个萌发孔。多重花粉管中只有 1 个能够到达细胞核,其他都会被抑制[30]。花粉离体培养时产生的多重花粉管现象会多于活体萌发[31]。其他 6 个品种超低温保存后的花粉没有观察到多重花粉管现象,因此并不能判定超低温保存是引起多重花粉管现象的原因。



a. 单个花粉管　　b. 二重花粉管　　c. 三重花粉管

图1　Lisbon 花粉管图示



a. 单个花粉管　　b. 二重花粉管　　c. 三重花粉管

图2　Florange 花粉管图示

3　讨论与结论

超低温保存后植株的遗传稳定性是利用该技术保存植物种质资源的关键问题。有关超低温保存对植物遗传稳定性的影响已经有比较多的研究[32],总体来说这些研究表明超低温保存后的植物材料是可以保持其遗传稳定性的。在本试验切花菊花粉的超低温保存中,出现了超低温保存后花粉活力明显高于新鲜花粉及超低温保存后花粉的授粉结实率也高于新鲜花粉的现象,这种现象在其他花卉的花粉超低温保存后也存在,如梅花[14,22]、白掌[16]、芍药[17]、牡丹[19]、榆叶梅和海棠[21]。这一现象反映出花粉在超低温保存过程中出现了生理上的变化,有可能是超低温冷冻及解冻的过程使花粉壁变得脆弱而有利于花粉的萌发,但其机制还须进一步研究。理论上来看,利用花粉超低温保存后活力提升的现象不仅可以实现花粉的长期保存,更可以利用超低温保存技术促进花粉萌发率与授粉结实率的提升,实现花粉品质的改良[16]。但由于超低温保存技术应用的历史并不长[33],花粉超低温保存的最长年限和可用年限以及长期保存后的杂交结实能力、杂交后代再生能力等长期效果尚待进一步研究。

切花菊为了观赏性的需要,在长期的选育过程中头状花

序高度瓣化,导致花序中间产生花粉的管状花很少,所以为了多收集花粉,在试验第 1 年共种植 4 批(分别于 4、6、8、10 月开花)切花菊以收集花粉及杂交育种。结果发现,虽然在温室环境中人工调控环境使其与秋菊自然开花的温度、光照和光周期尽量相同,但在 4、6、8 月开花的切花菊的雄蕊几乎都败育,雌蕊也发育不正常,难以收集到花粉进行授粉试验,只有在 10 月符合秋菊自然开花时间开放的切花菊雌雄蕊发育正常,可收集其花粉并进行授粉作业。另外,由于从国外直接引进的品种花粉量都较少,在后来的收集花粉和杂交育种中,采用了花粉量相对较多的作为育种中间材料的自育品种。

植物种质资源是植物育种工作的物质基础。作物遗传背景的多样化对农业的安全和可持续发展具有重要价值。植物超低温研究的最终目标就是通过超低温保存技术常规化的储存和利用植物种质资源,特别是农作物及其近缘种。超低温保存种质资源具有省时、省地、省空间和无病虫害侵染等优点,且设备简单、维护费用低、只须定期补充液氮,安全、经济,节省空间和人力。迄今,已经有多种农作物的超低温种植资源库建立和运行起来,濒危野生植物的超低温种质资源库也开始出现。花粉超低温保存技术还因其操作简便、即时使用的特点使得其在农作物育种中具有巨大的应用潜力。我国目前已建立了一些重要农作物的花粉超低温保存库,但在花卉育种中建立花粉超低温保存库的非常少,对于此项工作应加强重视和相关技术的研究。

参考文献:

[1]张树林,戴思兰. 中国菊花全书[M]. 北京:中国林业出版社,2013:2-6.

[2]Anderson N O. Flower breeding and genetics[M]. New York:Springer-Verlag,2006:389-437.

[3]Teixeira da Silva J A. Chrysanthemum:advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology[J]. Biotechnology Advances,2003,21(8):715-766.

[4]Zhao H E,Liu Z H,Hu X,et al. Chrysanthemum genetic resources and related genera of *Chrysanthemum* collected in China[J]. Genetic Resources and Crop Evolution,2009,56(7):937-946.

[5]胡　晋. 花粉的保存和生活力测定[J]. 种子,1992(6):33-35.

[6]吕晋慧,赵　耀,王　媛,等. 地被菊花粉活力和储藏性研究[J]. 园艺学报,2012,39(12):2483-2490.

[7]王春夏. 菊花育种技术及其 F_1 代杂种鉴定[D]. 武汉:华中农业大学,2004:27-28.

[8]Ganeshan S,Rajasekharan P E,Shashikumar S. Plant cryopreservation:a practical guide[M]. New York:Springer,2008:443-464.

[9]Engelmann F. Plant cryopreservation:progress and prospects[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant,2004,40(5):427-433.

[10]王　越,刘　燕. 观赏植物种质资源的超低温保存[J]. 植物生理学通讯,2006,42(3):559-566.

[11]Knowlton E H. Studies in pollen with special reference to longevity[J]. Cornell University Agricultural Experiment Station,1922,52:751-793.

[12]Volk G M. Collecting pollen for genetic resources conservation[J]. Collecting Plant Genetic Diversity,2011,25:1-10.

[13]张亚利. 梅花花粉超低温保存研究及其花粉库建立[D]. 北京:北京林业大学,2007:57-58.

[14]张亚利,陈瑞丹,张　波,等. 超低温保存的梅花花药萌发率和授粉后的结实能力[J]. 植物生理学通讯,2007,43(3):457-460.

[15]李广清. 山茶花粉超低温保存研究[D]. 北京:北京林业大学,2005:22-23.

[16]周英彪,彭卓伦,蒋雄辉,等. 白掌花粉活力检测及其超低温保存研究[J]. 中国农学通报,2013,29(1):113-117.

[17]李秉玲,尚晓倩,刘　燕. 芍药花粉超低温保存 4 年后的生活力检测[J]. 北京林业大学学报,2008,30(6):145-147.

[18]陶清波. 牡丹花粉超低温保存研究[D]. 北京:北京林业大学,2003:31-32.

[19]李秉玲,王　荷,刘　燕. 日本牡丹品种花粉超低温保存[J]. 北京林业大学学报,2010,32(4):297-300.

[20]孟令威,毕晓颖,郑　洋. 紫花鸢尾花粉萌发及贮藏性研究[J]. 中国农学通报,2012,28(28):192-197.

[21]樊新民,牛建新,孙爱新,等. 榆叶梅和海棠花粉萌发率的测定及超低温保存方法[J]. 湖北农业科学,2004(6):65-66.

[22]Zhang Y L,Chen R D,Huang C J,et al. Cryo-banking of *Prunus mume* pollen and its application in cross-breeding[J]. Cryo Letters,2009,30(3):165-170.

[23]孙春青,陈发棣,房伟民,等. 菊花远缘杂交研究进展[J]. 中国农业科学,2010,43(12):2508-2517.

[24]赵宏波,陈发棣,房伟民. 菊属植物花粉生活力检测方法的比较[J]. 浙江林学院学报,2006,23(4):406-409.

[25]Leduc N,Monnier M,Douglas G C. Germination of trinucleated pollen:formulation of a new medium for *Capsella bursa-pastoris*[J]. Sexual Plant Reproduction,1990,3(4):228-235.

[26]王四清,陈俊愉. 菊花和几种其他菊科植物花粉的试管萌发[J]. 北京林业大学学报,1993,15(4):56-60.

[27]李辛雷,陈发棣. 菊花自交不亲和性初步研究[J]. 武汉植物学研究,2007,25(6):591-595.

[28]陈晓玲,张金梅,辛　霞,等. 植物种质资源超低温保存现状及其研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(3):414-427.

[29]邢艳萍,张　建,吴　杰,等. 东北地区 5 种蒲公英花粉离体萌发条件及特性的研究[J]. 沈阳农业大学学报,2012,43(3):295-299.

[30]Mulcahy D L. Pollen tetrads in the detection of environmental mutagenesis[J]. Environmental Health Perspectives,1981,37(37):91-94.

[31]Jiang B,Shen Z G,Shen J B,et al. Germination and growth of sponge gourd (*Luffa cylindrica*) pollen tubes and FTIR analysis of the pollen tube wall[J]. Scientia Horticulturae,2009,122(4):638-644.

[32]Harding K. Genetic integrity of cryopreserved plant cells:a review[J]. Cryo Letters,2004,25(1):3-22.

[33]Caswell K L,Kartha K K. Recovery of plants from pea and strawberry meristems cryopreserved for 28 years[J]. Cryo Letters,2009,30(1):41-46.