

果树花粉的超低温保存

陈霜莹 常永健* 赵艳华 张 淳 刘 瑜 章德明

(河北省农林科学院昌黎果树研究所, 昌黎 066600)

摘 要 将苹果、梨、桃、李和樱桃等树种的 39 个品种的花粉干燥至含水量 10%~20%, 直接投入液氮中(-196℃), 经过一段时间保存后, 再以 40℃水浴快速化冻 1min, 然后鉴定其生活力和萌发力。结果表明, 花粉的生活力没有明显变化, 其离体萌发率与新鲜花粉相近。新鲜花粉含水量在 60%左右, 不宜用于液氮保存。花粉含水量是影响保存效果的关键因子之一, 只要花粉含水量适宜, 可以多次反复冷冻—化冻, 生活力不受影响。此项技术可用于果树花粉的长期保存。

关键词 超低温保存种质 花粉 果树

在超低温(液氮-196℃)条件下, 生物细胞内的新陈代谢活动基本停止, 处于“生机停顿”状态, 细胞、组织和器官在超低温保存过程中不会引起遗传性状的改变, 也不会丢失形态发生的潜能^[1]。因此, 近十多年来, 超低温冰冻保存作为种质长期贮藏的一条理想途径日益引起人们的注意和积极的试验研究^[1,2,13]。果树花粉的超低温保存与常规干燥、低温贮藏法相比, 具有保存期长、成本低廉、便于国际间的种质交换等优点。近年来, 果树花粉超低温保存作为果树种质长期保存的方式之一已在日本、美国、荷兰、英国等国家相继开展了研究^[3,9~12]。我国是世界上最重要的果树起源中心之一, 拥有丰富的果树资源, 保存技术的研究则更为必要。江雨生等^[4]曾对桃、梨四个品种进行了研究, 我们在此基础上进一步扩大了树种及品种范围, 对苹果、桃、梨、李、樱桃的 39 个品种的花粉进行了超低温保存试验, 旨在进一步研究超低温保存的影响因子, 完善花粉超低温保存技术。现将研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

苹果 (*Malus pumila* Mill), 梨 (*Pyrus bretschneideri* Rehd), 桃 (*Prunus perisica* L.), 李 (*P. salicina* Lindl), 甜樱桃 (*P. avium* L.) 等树种的 39 个品种的花粉, 采自昌黎果树研究所资源圃。

1.2 方

选择生长健壮的植株, 于初花期上午 8~10 时, 采摘大气球期的花朵放于塑料袋中, 在实验室取出花药, 薄摊在具渗透性的纸上, 放置于 25±2℃, 相对湿度 30%~40%, 弱光(1klx)条件下。自然散粉后, 过 80 目筛, 将花粉放于盛有脱水硅胶的干燥器中, 在 1~4℃黑暗条件下保存备用。按品种将花粉用硫酸纸包好, 放入 4ml 带螺旋盖的塑料冷冻管中, 密封后, 直接投入液氮罐中保存 24~48h。试验对比了三种化冻方式: 1) 40℃水浴中快速化冻 1min 转至室温。

2) 室温(22~26℃)化冻,约 10min。3) 自来水(17℃)冲洗化冻 3min。评定花粉的生活力用琼脂盘法^[8],测定其离体萌发率。每个品种涂两个载片。花粉萌发培养基成份是:10% 蔗糖,0.45%琼脂粉。 $100 \times 10^{-6} \text{H}_3\text{BO}_3$, $300 \times 10^{-6} \text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $200 \times 10^{-6} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $100 \times 10^{-6} \text{KNO}_3$ 。在 25℃ 黑暗条件下培养 4h 后镜检花粉的离体萌发率。花粉管长度超过花粉粒直径的花粉计为萌发。每品种统计 6 个视野,共 700~900 粒花粉。重复两次,以不冷冻的花粉作为对照。花粉粒含水量的测定采用烘干法。

2 结果与讨论

2.1 苹果花粉含水量对超低温保存效果的影响

刚刚采集的新鲜苹果花粉含水量在 60% 左右,进入液氮保存时,因含水量过高,易引起细胞内结冰,造成细胞膜的损伤。解冻后,花粉潮湿结团,生活力大幅度下降,花粉离体萌发率仅 23.9%(表 1)。而花粉含水量下降至 10.5%~21.4%,经液氮保存,同未经超低温保存的新鲜花粉(对照)比较,萌发率没有明显的差别(表 1)。说明花粉的含水量下降到细胞内可冻水最少,而又不致伤害细胞结构为最好。苹果花粉的含水量在 10%~20%,对超低温保存是适宜的。这与江雨生等人在桃、梨上的研究结果相近^[4]。在硅胶干燥器中贮藏 10~20d 的多个苹果品种的花粉,其含水量均在 10%~15% 之间,可用于花粉超低温保存前的脱水。

表 1 苹果花粉含水量对超低温保存后离体萌发率的影响

项 目	未经超低温保存	经 超 低 温 保 存			
		I	II	III	IV
含水量(%)	64.5	64.5	45.6	21.4	10.5
离体萌发率(%)	83.2	23.9	59.2	76.8	83.9

2.2 化冻方式对超低温保存苹果花粉的影响

表 2 不同化冻方式对苹果花粉离体萌发率的影响

品 种	对照(未冷冻)	40℃水化冻	自来水化冻*	空气中化冻*
胜 利	85.6	90.3	76.4	59.4
国 光	79.7	82.6	65.8	71.0
岩富 10	88.1	92.8	76.5	66.7
津 轻	81.6	70.6	42.7	56.0
珍宝王林	72.6	80.0	42.2	46.2
元 帅	92.8	92.7	81.4	82.5

* 培养 24 小时后调查萌发率

表 2 三种化冻方法比较结果表明,以 40℃ 水浴快速化冻效果最好。另外两种化冻方法的花粉存活率有不同程度的下降,并且花粉的萌发推迟。离体培养 4h,仅有 20%~40% 的萌发

率,但随着时间的延长,一部分花粉陆续萌发,说明尽管花粉含水量较低,但采用慢速化冻仍有发生细胞内次生结冰的可能,对花粉有一定程度的伤害,影响花粉的生活力,萌发率降低;而对轻度伤害的花粉,培养时需经一个自我修复过程,表现延迟萌发的现象。

2.3 冷冻次数对果树花粉生活力的影响

江雨生^[4],Sedgley^[6]认为超低温条件下保存的花粉,经反复冷冻—化冻会造成生活力的锐减。因此,宜用小包装入罐,根据需用量,一次取出用尽。这种做法给实际应用带来不便。本实验研究发现苹果、梨、桃、樱桃等树种的花粉在重复冷冻—化冻条件下,生活力的降低与在这个过程中花粉含水量的变化有关。当花粉由 -196°C 直接升至室温时,粒体表面湿度低,易凝结空气中的水份,导致花粉吸水,使其含水量增加。用这些花粉再直接冷冻,则因其含水量高而使生活力锐减。因此,在花粉重复冷冻之前需要再干燥,使其含水量重新恢复到适宜范围内(10%~20%)。本试验结果证明,苹果、梨、桃、樱桃等树种的花粉虽经重复冷冻—化冻多次,其离体萌发率并无明显变化(表3)。循此,在长期保存中,每个品种的花粉可用一个容器包装,无碍于多次重复使用。

表3 冷冻次数对果树花粉离体萌发率的影响 (%)

品 种	未冷冻(对照)	冷 冻			
		1 次	2 次	3 次	4 次
苹 果					
胜 利	85.6	86.0	85.2	89.4	87.2
青 富 13	90.9	87.7	89.5	88.5	89.0
岩 富 10	88.1	88.4	91.5	91.5	90.1
普通富士	88.2	92.0	92.1	—	—
秋富—1	84.5	88.4	89.6	—	—
长富—1	85.0	88.1	88.0	—	—
红 月	79.4	78.1	82.9	—	—
梨					
雪花梨	91.4	97.5	95.9	—	—
鸭 梨	75.1	73.6	74.4	—	—
桃					
白香蜜	94.3	87.2	93.1	—	—
白 花	81.0	85.8	82.4	—	—
樱 桃					
80	76.6	86.5	82.4	—	—

2.4 果树花粉的超低温保存

应用快速冷冻技术进行超低温保存后,经 40°C 水浴快速化冻的试验结果表明,花粉的离体萌发率,萌发时间,花粉管的形态及伸长速度等方面与未冷冻的花粉均无明显变化(表4,附图)。有的品种尤其是桃的多数品种花粉超低温保存后其离体萌发率比新鲜花粉还要高。在黑麦、黑核桃等植物上也有类似现象报道^[5,7],其机理有待进一步研究。

液氮保存果树花粉同保存其它生物材料一样,在花粉含水量适宜的情况下,冷冻与解冻方法是成败的关键,此两项技术解决之后,保存时间不是影响生活力变化的主要因素,长期保存是有可能的。而且已有大量实验证明,离体萌发培养具有萌发能力的花粉即有结实能力^[4]。目

表 4 果树花粉超低温保存后离体萌发率 (%)

品 种	未冷冻(对照)	冷冻后	品 种	未冷冻(对照)	冷冻后
苹 果			桃		
珍宝王林	72.6	80.0	深州白蜜实生	55.8	65.9
胜 利	85.6	90.3	香山水蜜	78.1	88.0
秋富-1	85.0	88.1	红蜜桃	88.1	93.2
海 棠	75.4	70.6	京蜜桃	77.2	91.8
王 林	68.5	65.3	早白凤	59.8	71.5
青富 13	90.9	83.9	庆 丰	82.0	80.5
红 月	69.4	78.1	山东水蜜	81.5	81.6
津 轻	81.6	70.6	玉 露	76.0	89.5
国 光	79.7	82.6	园春白	64.0	68.4
岩富-10	88.1	92.8	加香美	70.0	74.6
元 帅	92.8	92.7	红干露	86.2	87.0
嘎 拉	70.2	61.0	白香蜜	94.3	87.2
普通富士	88.2	92.0	白 花	71.0	85.8
长富-1	85.0	88.1	蟠 桃	85.6	92.3
矮俄罗岗	90.3	97.7	樱 桃		
唐短金冠	67.4	59.9	红 艳	80.3	73.3
28-2-3	60.7	57.6	红 蜜	67.8	78.0
梨			80	76.6	86.5
蜜 梨	79.8	88.7	李		
雪花梨	91.4	97.5	甜黄李	70.4	81.8
鸭 梨	75.1	73.6	红心李	41.4	58.9

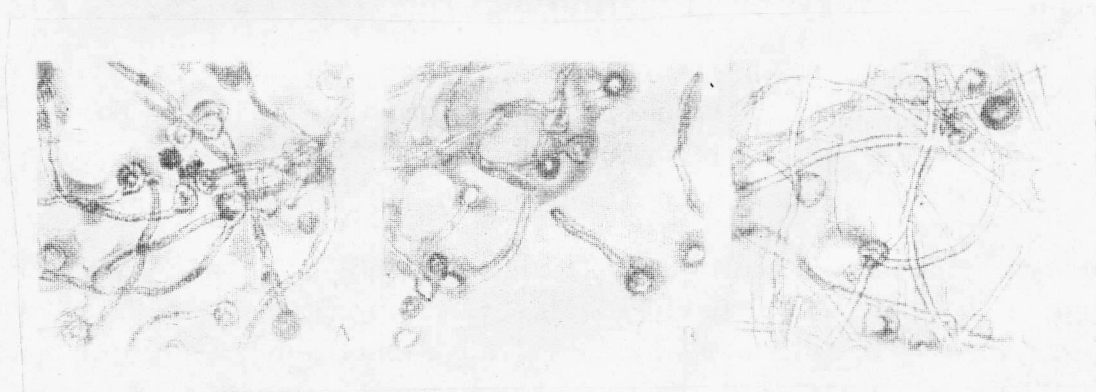


图 花粉在培养基上的萌发

A 苹果花粉($\times 400$); B 梨花粉($\times 400$); C 桃花粉($\times 400$)

前,我们已在液氮中保存了 6 个树种的 50 多个品种的花粉,作为进一步验证存活率与保存时间以及结实率的关系之用,为落叶果树花粉超低温保存库的建立提供依据。

参 考 文 献

- 1 简令成. 组织细胞培养物的超低温保存种质库的建立. 见:孙敬三,陈维伦主编. 植物生物技术和作物改良. 北京:中国学术出版社,1990,254~280

- 2 常永健等. 苹果茎尖的超低温保存研究. 见:中国科协首届青年学术年会论文集(农科分册). 北京:中国科学技术出版社,1992,461~464
- 3 汪祖华,林静波. 日本果树种质资源的保存研究. 国外农学——果树,1987,(3):35~37
- 4 江雨生,高铸九. 超低温冷冻保存果树(桃、梨)花粉. 见:作物种质资源保存技术. 北京:学术书刊出版社,1989,167~172
- 5 石思信,田玥. 黑麦花粉超低温长期冷冻保存试验初报. 见:作物种质资源保存研究论文集,北京:学术书刊出版社,1989,92~96
- 6 于振忠. 果树种质资源保存及研究的现状. 农牧情报研究,1988(8):21~28
- 7 Farmer RE Jr, Barnett PE. Low temperature storage of black walnut pollen. Cryobiology, 1974, 11:336
- 8 King JR, Hesse CO. Pollen longevity studies with deciduous fruits. Proc Amer Soc Hort Sci, 1938, 36: 310~313
- 9 Koopowitz HR et al. Long-term storage of gladiolus pollen. Hort Science, 1984, 19(4): 513~514
- 10 Omura M et al. Pollen preservation of fruit trees for genebanks in Japan. IBPGR Newsl, 1980 43:28
- 11 Parfitt DE et al. Liquid nitrogen storage of pollen from five cultivated *Prunus* species. Hort Science, 1984, 19(1):69~70
- 12 Towill LE. In: Cryopreservation of plant cells and organs (Kantha KK ed). CRC Press, 1985,171
- 13 Wither LA. Maintenance of plant tissue cultures. In: Plant Tissue Cultures. Intern Board for Plant Genetic Resources. Roma, 1991, 243~267

Supercryopreservation of Fruit Tree Pollens

Chen Shuangying Chang Yongjian Zhao Yanhua Zhang Bo
Liu Yu Zhang Deming

(Changli Pomology Institute, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Changli)

Abstract The pollens from 39 varieties of fruit trees—apple (*Malus pumila* Mill), pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd), peach (*Prunus perisica* L.), plum (*P. salicina* Lindl), and cherry (*P. avium* L.) were dried for water content to decrease to 10%—20% before being put into liquid nitrogen for a period of time, and then thawed in 40℃ water bath for 1 min. The result showed that the viability and the germination capacity of pollens *in vitro* treated in this way approached those of fresh pollens. The fresh pollen with 60% of water can not be stored in liquid nitrogen. The water content in pollens is one of the factors influencing the result of fruit storability in liquid nitrogen. If the water content in pollens is suitable for supercryopreservation, the process of freezing-thawing of stored pollens can be repeated some times, and the pollen viability can not be influenced. This technology can be used for long-term conservation of fruit pollens.

Key words: Germplasm supercryopreservation; Pollen; Fruit trees