

百合花粉超低温保存方法研究

时婷婷¹, 张桂玲¹, 温四民², 路嘉丽¹

(1. 临沂大学 生命科学学院, 山东 临沂 276005; 2. 临沂大学 实验管理中心, 山东 临沂 276005)

摘 要:以“索邦”和“西伯利亚”百合为试材,研究了不同干燥时间和不同预处理温度及不同化冻方式对花粉超低温保存后百合花粉萌发率的影响。结果表明:不同干燥时间和不同预处理温度对超低温保存后花粉的萌发率有显著影响。与对照相比,2 h 干燥预处理(即花粉的含水量分别为 7.67%和 7.27%)后百合花粉的萌发率显著高于 1、3、4 h 处理的; -20℃低温预冻处理后百合花粉的萌发率显著高于 CK(室温)、0℃、-70℃处理的;超低温保存后 40℃水浴化冻效果最佳。

关键词:百合;花粉;超低温保存

中图分类号:S 682.2⁺9

文献标识码:A

文章编号:1001-0009(2013)03-0064-03

百合(*Lilium* spp.)因其花色丰富、姿态优美,被广泛应用于鲜切花、园林布景及盆栽观赏等方面。目前,百合育种的主要方法是杂交育种,而具有较高生命力的花粉是确保杂交成功的重要条件。花期不遇是百合杂交过程中经常遇到的问题之一,适宜的花粉贮藏条件是解决该问题的关键。

超低温保存(-196℃)由于操作简单、保存成本低、避免病虫害的引入、克服传统杂交育种时间和空间的限制等优点,是目前唯一可行的长期而稳定地保存种质资源的方法^[1-2]。而影响植物花粉超低温保存效果的因素很多,其中花粉的含水量^[3-5]、保存时间^[6-7]、预冻处理及解冻方法^[8-9]等都会对花粉保存效果有一定的影响。目前,有关百合花粉超低温保存技术的研究甚少。现以“索邦”(‘Sorbonne’)和“西伯利亚”(‘Siberia’)百合为试材,进行干燥和预冻处理,并在此基础上采用 3 种解冻方法对百合花粉进行超低温保存研究,探讨百合花粉超低温保存的关键技术,为其超低温保存提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试百合品种为“索邦”(‘Sorbonne’)和“西伯利亚”(‘Siberia’),均取自临沂百合研究开发中心。

1.2 试验方法

1.2.1 百合花粉的预处理试验 干燥预处理试验:将

晴天搜集当天开放的百合花粉于 4℃条件下等量放入 1.5 mL 冻存管内(每管装载容积的 1/3),敞开管口垂直放于干燥器内,以硅胶(4 L 干燥器中加入 1 kg 硅胶)干燥不同时间(1、2、3、4 h)后,以不干燥为对照 CK,再将干燥及对照的冻存管,外包扎薄纱布,并放上少量铁钉等重物,使冷冻管放进液氮后能够下沉浸在液氮中。贮藏时间分别为 60、120、180、240、300、360 和 420 d,3 次重复。采用 40℃水浴化冻 2 min,测定花粉的萌发率。预冻试验:将晴天搜集当天开放的百合花粉等量放入 1.5 mL 冻存管内(每管装载容积的 1/3),分别在 CK(室温)、0、-20、-70℃条件下 30 min 后,立即投入液氮中,3 次重复。贮藏时间分别为 60、120、180、240、300、360 和 420 d,3 次重复。采用 40℃水浴化冻 2 min,测定花粉的萌发率。

1.2.2 百合花粉的化冻试验 将晴天搜集当天开放的百合花粉等量放入 1.5 mL 冻存管内(每管装载容积的 1/3),立即投入液氮中。60 d 后分别进行 40℃水浴化冻 2 min,25℃室温下化冻,4℃冰箱中缓慢复苏 3 种化冻方法试验,3 次重复,测定花粉的萌发率。

1.3 项目测定

将花粉均匀散布在花粉萌发培养基上(培养基配方:硝酸钙 300 mg/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ + 200 mg/L MgSO_4 + 200 mg/L KNO_3 + 200 mg/L H_3BO_4 + 20 g/L 蔗糖,调节 pH 为 6.5,在 121℃湿热灭菌 30 min 后使用),将花粉在 25℃下萌发 12 h,然后统计 1 000 粒花粉萌发率,3 次重复。花粉萌发率 = 萌发的花粉粒数 / 花粉总粒数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 不同含水量对百合花粉超低温保存后萌发率的影响

由表 1 可知,不同的干燥时间即不同含水量对“索

第一作者简介:时婷婷(1991-),女,硕士,研究方向为园林植物遗传育种。

责任作者:张桂玲(1975-),女,讲师,研究方向为园林植物遗传育种。E-mail:guilingzhang2003@126.com.

收稿日期:2012-10-23

邦”和“西伯利亚”百合花粉的萌发率影响较大。同一贮藏时间,与对照相比,多数干燥处理的花粉其萌发率显著提高,其中干燥 2 h 的花粉萌发率显著高于其它处理的,贮藏 60 d 时,“索邦”和“西伯利亚”百合花粉萌发率分别为 72.15%和 68.12%。同一干燥时间的花粉即同一含水量的花粉,随着花粉贮藏时间的延长,花粉的萌

发率逐渐降低。以干燥 2 h 花粉的萌发率进行方差分析,差异均达到显著水平,但没有达到极显著水平,贮藏 420 d 时“索邦”和“西伯利亚”百合花粉的最低萌发率分别为 60.12%和 58.02%,这说明含水量相同的百合花粉在超低温保存条件下花粉的萌发率受贮藏时间的影响不是很大。

表 1 不同干燥时间(含水量)对百合花粉超低温保存后花粉萌芽率的影响

Table 1 The effect of different drying time on the germination rate of <i>Lilium</i> spp pollen after crypreservation %										
贮藏时间 Storage time/d	“索邦”(‘Sorbonne’)					“西伯利亚”(‘Siberia’)				
	0 h(CK) (21.29)	1 h (18.75)	2 h (7.67)	3 h (5.23)	4 h (3.48)	0 h(CK) (23.24)	1 h (19.16)	2 h (10.62)	3 h (7.27)	4 h (3.24)
60	67.21bc	65.32bc	72.15a	68.15ab	60.25c	59.11b	60.31b	68.12a	65.13ab	58.11b
120	48.71d	61.76b	70.68a	62.23b	55.24c	47.61cd	61.66b	66.58a	61.24b	50.61c
180	43.90d	59.77ab	62.89a	57.23b	50.29c	40.91d	58.72b	63.84a	55.27b	48.91c
240	40.09d	53.42b	60.49a	53.48b	46.32c	38.19d	50.32b	60.29a	50.68b	45.19c
300	20.15e	49.56b	60.32a	38.36c	32.16d	17.05e	46.58b	59.33a	36.46c	29.05d
360	7.60d	42.86b	60.13a	21.51c	17.52c	6.62e	42.56b	59.15a	19.58c	15.62d
420	3.20e	40.26b	60.12a	19.11c	10.13d	2.21e	40.22b	58.02a	16.13c	9.21d

2.2 不同预处理温度对百合花粉超低温保存后萌发率的影响

由表 2 可知,不同的预处理温度对“索邦”和“西伯利亚”百合花粉的萌发率影响较大。同一贮藏时间,与对照相比,不同预处理温度花粉其萌发率显著提高,其中-20℃的预处理效果最好,萌发率最高,贮藏 60 d 时,“索邦”和“西伯利亚”百合花粉萌发率分别为 60.31%和 59.32%,其次是 0℃,室温条件下最差。同一预处理温度的花粉,随着花粉贮藏时间的延长,花粉的萌发率逐渐降低。以-20℃的花粉的萌发率进行方差分析,差异均达到显著水平,但没有达到极显著水平,贮藏 420 d 时,“索邦”和“西伯利亚”花粉的最低萌发率分别为 50.88%和 47.77%,这说明同一预处理温度的花粉在超低温保存条件下花粉的萌发率受贮藏时间的影响不是很大。

表 2 不同预处理温度对百合花粉超低温保存后花粉萌发率的影响

Table 2 The effect of different pretreatment temperature on the germination rate of <i>Lilium</i> spp pollen after crypreservation									
贮藏时间 Storage time/d	“索邦”(‘Sorbonne’)				“西伯利亚”(‘Siberia’)				
	CK (室温)	0℃	-20℃	-70℃	CK (室温)	0℃	-20℃	-70℃	
60	45.19c	53.43c	60.31ab	58.91b	42.53c	51.92b	59.32a	46.75c	
120	37.68c	50.42b	57.08a	42.42c	35.84c	48.15b	54.43a	38.53c	
180	30.55c	44.52b	54.77a	38.90c	30.92d	44.33b	50.75a	36.72c	
240	28.38d	40.44b	52.07a	34.61c	27.90d	40.55b	48.47a	31.88c	
300	12.63d	26.62b	51.39a	20.10c	11.35d	24.88b	48.23a	17.13c	
360	5.55c	8.82b	51.13a	8.33b	5.56c	7.69b	47.89a	6.35bc	
420	2.89c	6.05b	50.88a	5.78b	2.66bc	4.35b	47.77a	3.36b	

2.3 不同化冻方式对百合花粉超低温保存后萌发率的影响

由表 3 可知,不同的化冻方式对“索邦”和“西伯利亚”百合花粉的萌发率影响较大。水浴化冻后花粉的萌发率极显著高于其它 2 种化冻方式,而室温化冻与缓慢复苏之间差异不显著。

表 3 不同化冻方式对百合花粉萌发率的影响

Table 3 The effect of different thaw methods on the germination rate of <i>Lilium</i> spp pollen after crypreservation		
化冻方式 Thaw methods	“索邦” (‘Sorbonne’)	“西伯利亚” (‘Siberia’)
25℃室温下化冻	60.35bB	59.21bB
40℃水浴化冻 2 min	79.42aA	69.81aA
4℃冰箱中缓慢复苏	57.12bB	57.92bB

3 讨论

花粉含水量的大小是决定花粉超低温保存成功与否的关键因素^[2]。花粉含水量过高在超低温下细胞内容易结冰过多,造成细胞膜受损,影响保存后的活力,但花粉含水量太少(生理缺水)也会影响保存后的活力。不同植物进行花粉超低温保存时要求有适宜的含水量,核桃^[10]为 7.5%以下,‘广杏’^[11]为 13.2%~20.8%,部分梅花^[2]品种高达 40%。该试验中,“索邦”和“西伯利亚”百合新鲜花粉干燥 2 h,即含水量分别为 7.67%和 10.62%时,超低温保存后的花粉生活力最高,这说明花粉的含水量是实现花粉超低温保存的首要因素,同时植物植物种类、品种的差异也是不容忽视的重要因素。有关花粉超低温保存时间的研究,王玉萍等^[6]和傅鸿妃等^[7]认为利用正确的步骤对植物花粉进行超低温保存,保存时间的长短对花粉的生活力没有显著影响。美国

山核桃花粉超低温保存了 10 a 以上的仍具有生活力^[12]；牡丹^[13]、梅花^[14]等植物花粉在超低温保存 1~2 a 后仍具有生活力；芍药^[15]花粉超低温保存 4 a 后的仍具有受精结实能力。该试验中同一含水量不同的贮藏时间对 2 种百合花粉的萌发率有一定的影响，差异达到显著水平，与上述报道不同，关于这一点有待于进一步研究。

预冻处理能够使细胞内的水分脱出，在细胞外结冰，尽量减少胞内结冰对原生质的损害。在花粉超低温保存中，刘燕等^[14]报道植物种类不同和花粉含水量不同，预冷冻的效果差异较大。陶清波^[13]认为预冷冻处理对牡丹花粉超低温保存后的萌发率影响不大；赵树任等^[16]认为，-25℃预冷冻处理能显著提高番茄花粉超低温保存后的萌发率。刘燕等^[14]报道在超低温保存时，花粉的含水量是决定是否进行预冻处理的关键，在含水量较低时，直接投入液氮的保存效果好于经过预冻处理的，这可能与直接投入液氮后花粉细胞内的水来不及结冰，直接达到玻璃化状态有关；而在花粉含水量较高时，经过预冻处理的效果好于直接投入液氮的，这可能由于预冷冻后细胞内的水流到细胞外结冰，发生保护性脱水有关。该试验中，-20℃的预处理效果最好，“索邦”和“西伯利亚”百合花粉的萌发率最高，分别为 60.31% 和 59.32%，花粉的含水量也较高，分别为 21.29% 和 23.24%，与上述报道的基本一致。

许多研究认为，冰冻和化冻 2 个过程是液氮保存时防止植物受到伤害的关键。因此，选择合适的化冻方法是植物种质超低温保存获得成功的重要因素。王彩虹等^[11]以含水量为 7.2%~7.3% 的杏花粉为材料，采用 0、16 和 37℃ 3 种温度进行化冻，结果 3 种化冻温度效果都显著。刘燕等^[14]以梅花花粉为材料，采用室温、自来水冲洗及温水浴 3 种化冻方法，结果表明来水冲洗及温水浴效果较好，室温化冻效果一般较差。该试验中，水

浴化冻后“索邦”(含水量为 21.29%)和“西伯利亚”百合(含水量为 23.24%)花粉的萌发率均极显著高于其它 2 种化冻方式，而室温化冻与缓慢复苏之间差异不显著。

参考文献

- [1] 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,2008,4(3):75-82.
- [2] 张亚利,尚晓倩,刘燕.花粉超低温保存研究进展[J].北京林业大学学报,2006,28(4):139-147.
- [3] 梁立,徐秉芳,郑从义,等.油菜花粉超低温保存及花粉原生质体分离[J].武汉大学学报(自然科学版),1993(6):133-136.
- [4] 胡晋,郭长根.超低温(-196℃)保存杂交水稻恢复系花粉的研究[J].作物学报,1996,22(1):72-77.
- [5] 汤青林,宋明,王小佳.甘蓝自交不亲和系花粉的离体保存[J].西南农业大学学报(自然科学版),2003,25(4):293-296.
- [6] 王玉萍,张峰,王蓓.马铃薯花粉的超低温保存研究[J].园艺学报,2003,30(6):683-686.
- [7] 傅鸿妃,张明方.保存温度对甜瓜花粉生活力的影响[J].果树学报,2005,22(2):190-192.
- [8] 张富云,王彩虹.保存温度对梨花粉发芽率影响的研究[J].烟台果树,2004,85(1):3-4.
- [9] 孙晓梅,王大政,杨洪光,等.不同处理和贮藏方法对百合花粉生活力的影响[J].辽宁农业科学,2000(6):27-30.
- [10] Luza J G, Polito V S. Cryopreservation of english walnut (*Juglans regia* L) pollen[J]. Euphytica, 1988, 37: 141-148.
- [11] 王彩虹,李嘉瑞.杏花粉的低温与超低温贮藏研究[J].莱阳农学院学报,1996,13(2):169-173.
- [12] Sparks D, Yates I E. Pecan pollen stored over a decade retains viability[J]. Hort Science, 2002, 37(1): 176-177.
- [13] 陶清波.牡丹花粉超低温保存研究[D].北京:北京林业大学,2003.
- [14] 刘燕,张亚利.梅花花粉的超低温保存研究[J].北京林业大学学报,2004,26(增刊):22-25.
- [15] 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.
- [16] 赵树任,武丽英,姚民昌.番茄花粉超低温保存研究[J].园艺学报,1993,20(1):66-70.

Study on Cryopreservation Methods of *Lilium* spp Pollens

SHI Ting-ting¹, ZHANG Gui-ling¹, WEN Si-min², LU Jia-li¹

(1. College of Life Science, Linyi University, Linyi, Shandong 276005; 2. Experimental Management Center, Linyi University, Linyi, Shandong 276005)

Abstract: Taking ‘Sorbonne’ and ‘Siberia’ lily as test materials, the effect of different drying time and different pretreatment temperature and different thawing methods on pollen germination rate after cryopreservation were studied. The results showed that drying time and pretreatment temperature affected the pollen germination after cryopreservation. The germination viability of pollen for 2 h drying pretreatment (with water content of 7.67% and 7.27% respectively) were higher than that of 1, 3, 4 h. The germination viability of pollen for -20℃ temperature pretreatment was higher than that of CK, 0℃, -70℃. Thawing method for 40℃ was better than other two treatments.

Key words: *Lilium* spp; pollen; cryopreservation