

二乔玉兰花粉贮存条件的比较研究

张亚利^a, 田振坤^a, 刘燕^{a,b*}

(北京林业大学, a. 园林学院; b. 国家花卉工程技术研究中心, 北京 100083)

摘要:探讨了二乔玉兰 (*Magnolia soulangeana* Soul.-Bod.) 花粉在不同温度和贮存条件下的活力。结果表明:二乔玉兰花粉在 5%蔗糖+0.01%硼酸及 5%蔗糖+0.1%硼酸两种培养液上萌发较好,萌发率均达到 70%以上。随着保存时间的延长,花粉萌发率不断降低,降低速度从快到慢依次为室温、5℃和 -20℃。超低温 (-196℃) 保存花粉的萌发率并没有随着保存时间的延长而降低,液氮保存 2 a 的花粉萌发率达到 79.3%,与新鲜花粉的萌发率差异不显著。超低温反复冻存 6 次的花粉萌发率与新鲜花粉没有显著变化。

关键词:二乔玉兰;花粉;萌发率;贮存;超低温保存

中图分类号:Q944.42

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2006)04-0318-03

Preservation Methods of Pollen of *Magnolia soulangeana* Soul.-Bod.

ZHANG Ya-li^a, TIAN Zhen-kun^a, LIU Yan^{a,b*}

(Beijing Forestry University, a. College of Landscape Architecture; b. National Floriculture Engineering Research Center, Beijing 100083, China)

Abstract: Viability of pollen of *Magnolia soulangeana* was tested at different storage temperatures and methods. Culture solution of 5% sucrose supplemented with 0.01% or 0.1% boric acid gave good results for pollen germination, the germination rate reaching to above 70%. Pollen viability declined with the increased preservation time. The decrease of pollen viability was slowered in the order of room temperature, 5°C, and -20°C. Cryogenic storage at -196°C had no significant changes, even though the pollen stored for 2 years, the germination rate being 79.3%. Pollen samples exhibited high tolerance to re-freezing and thawing.

Key words: *Magnolia soulangeana*; Pollen; Germination rate; Storage; Cryopreservation

木兰科 (Magnoliaceae) 植物花大芳香, 树型优美, 具有极高的观赏价值, 广泛应用于园林及庭院绿化。木兰科植物的研究工作也越来越受到人们的重视。杂交育种是目前培育木兰科新品种的主要方法之一, 花粉生活力的测定和不同保存温度对花粉生活力的影响研究对于木兰科植物的杂交育种及资源保存具有重要意义。本文以北方重要的早春观赏花木二乔玉兰 (*Magnolia soulangeana* Soul.-Bod.) 为试验材料, 探讨了花粉萌发培养基的筛选和花粉保存方法, 为其资源保存及利用提供参考。

1 材料和方法

二乔玉兰 (*Magnolia soulangeana* Soul.-Bod.) 花粉于 2003 及 2004 年 3 月采自北京林业大学校园。将微开的花朵带回实验室, 取出花药置于铺有硫酸纸的培养皿中室温散粉后收集花粉备用。

花粉萌发率的测定采用悬滴法^[1]。最佳培养基的确定采用单因素法。蔗糖浓度采用 0% (自来水)、5%、10% 和 15% 4 种梯度; 硼酸浓度对萌发率的影响在 5% 蔗糖条件下采用 0%、0.01%、0.1%、

收稿日期: 2005-12-16 接受日期: 2006-04-10

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20050022002) 资助

* 通讯作者 Corresponding author

1%、5% 5种梯度。培养温度为22–24℃,培养时间为4 h。花粉萌发以花粉管长度超过花粉粒直径的2倍为标准。每一处理重复3次,每重复随机选取3个视野观察花粉的萌发情况,然后计算平均值并统计萌发率。

2003年采集的花粉采用:(1)硫酸纸包装室温放置;(2)青霉素小瓶包装后放在干燥皿中于冷冻室(-20℃)保存;(3)Denmark产1.8 ml冻存管包装后直接投入液氮(-196℃)保存。2004年加大花粉采集数量,1.8 ml离心管包装后分别放在室温、冷藏室(5℃)、冷冻室(-20℃),1.8 ml冻存管包装后直接投入液氮(-196℃)保存,对花粉的最佳贮存方法进行验证。

花粉的超低温保存采用花粉的采集-干燥-密封包装-投入液氮容器保存-解冻复苏-应用的技术路线^[2]。液氮保存后采用自来水冲洗法进行化冻。花粉反复冻存效果的评价以一次性冻存花粉的萌发率为对照。

花粉含水量测定采用烘干法^[3],烘干温度为120℃,烘干时间45–60 min,反复2–3次,直至恒重。花粉含水量=花粉鲜重-花粉干重/花粉鲜重×100%。

2 结果和分析

2.1 花粉适宜萌发培养基

在5%的蔗糖溶液中花粉的萌发率最高,达到33.9±3.73%。10%和15%的蔗糖对萌发率的影响不显著,分别为17.2±2.51%和14.7±1.51%,但显著低于5%蔗糖培养液的萌发率。花粉在自来水中可以萌发,但萌发率仅为9.7±0.80%左右。可见在所设定的4种蔗糖浓度中,5%蔗糖的效果最好。

在5%蔗糖浓度的基础上,实验进一步进行了不同浓度硼酸对花粉萌发率的影响。结果见表1,随着硼酸浓度的增加,花粉萌发率呈先升后降的趋势。0.01%和0.1%的硼酸浓度能显著提高花粉的萌发率,花粉萌发率高达70%以上。

结果表明,不同浓度的蔗糖和硼酸对二乔玉兰花粉萌发率有很大的影响:在5%蔗糖+0.1%硼酸和5%蔗糖+0.01%硼酸两种培养液中花粉萌发率差异不显著,达到70%以上,比实验中其他培养液的萌发率显著提高。在实际应用中可以采用5%蔗糖+0.01%硼酸进行二乔玉兰花粉萌发率的测定。

表1 不同硼酸浓度对花粉萌发率的影响

Table 1 Effects of different concentrations of H₃BO₃ on pollen germination rates

蔗糖 Sucrose (%)	硼酸 H ₃ BO ₃ (%)	萌发率 Germination rate (%)
5	0.1	79.8±1.15 ^a
5	0.01	76.5±2.57 ^a
5	0	38.5±1.84 ^b
5	1	0 ^c
5	5	0 ^c

培养温度为22–24℃,不同字母表示在0.05水平上差异显著。Pollens were cultured at 22–24℃, values followed by different letters are significant at the P=0.05 (LSD test).

2.2 花粉贮存方法的对比

分别在2003和2004年进行了室温(20–24℃)、5℃、-20℃和-196℃4种不同温度下花粉贮存效果的比较。结果表明(表2),随着贮存温度的降低,花粉的保存时间逐渐延长。花粉萌发率降低速度从快到慢依次为室温(20–24℃)、5℃、-20℃、-196℃保存花粉随着保存时间的延长,花粉萌发率基本保持不变。室温条件下随着保存时间的延长花粉萌发率不断降低,保存1a的花粉萌发率已经降为0;5℃保存的花粉降低到8.6%, -20℃保存20–30 d后花粉的萌发率由77.5%降至56.8%,保存1a后降到49.1%;在-196℃中保存的花粉,萌发率并没有随着保存时间的延长而降低,保存2a后萌发率仍有79.3%,与新鲜花粉差异不显著。由此可见,室温、冷藏和冷冻

表2 保存时间和温度对二乔玉兰花粉萌发率的影响

Table 2 Effects of storage time and temperature on pollen germination rate (%)

保存时间 Storage time	温度 Temperature (°C)			
	20–24	5	-20	-196
0	77.3±4.17 ^a	77.1±1.91 ^a	77.3±4.17 ^a	77.3±4.17 ^a
8–10 d	45.8±3.62 ^b	80.2±1.15 ^a	79.3±1.85 ^a	77.0±2.92 ^a
20–30 d	16.9±3.42 ^c	69.1±4.84 ^b	56.8±6.64 ^b	74.5±4.74 ^a
1a	0 ^d	8.6±1.00 ^c	49.1±8.89 ^b	78.7±3.70 ^a
2a	-	-	-	79.3±1.95 ^a

不同字母表示在0.05水平上差异显著。室温(20–24℃)、-20℃和-196℃为2003和2004年平均值,5℃为2004年结果。Values followed by different letters are significant at the P=0.05 (LSD test). Values at room temperature (20–24℃), -20℃ and -196℃ were means from 2003 and 2004, and that at 5℃ were from 2004.

室均无法实现花粉的长期保存,超低温是二乔玉兰花粉长期保存的最佳方法。

2.3 超低温保存花粉的反复冻存

为了探讨超低温保存花粉反复取用是否会对花粉萌发率造成影响,对超低温保存的二乔玉兰花粉反复取用和一次性取用的花粉萌发率进行了比较。结果表明(表 3),在二乔玉兰花粉含水量为 21.9% 时,一次性冻存不同时间的花粉萌发率基本不变,均在 70% 以上;反复冻存 6 次后的花粉萌发率达到 75.4%,与新鲜花粉的萌发率差异不显著。由此推断在超低温情况下的反复取用并没有对花粉造成伤害,但反复取用的结果是否与含水量密切相关以及反复取用的最高次数还有待于进一步研究。

表 3 超低温保存方法对二乔玉兰花粉萌发率的影响

Table 3 Effect of cryopreservation methods on pollen germination rate (%)

保存时间 Storage time	一次性保存 Cryopreserved once	反复保存 Cryopreserved repeatedly
0	77.1±1.91 ^a	77.1±1.91 ^a
10min	75.7±3.75 ^a	77.8±4.85 ^a
1h	77.3±4.41 ^a	76.9±6.09 ^a
1d	73.3±3.36 ^a	74.2±2.10 ^a
10d	75.7±3.75 ^a	72.6±1.45 ^a
1m	73.4±2.72 ^a	73.6±1.31 ^a
1a	76.1±2.96 ^a	75.4±3.55 ^a

相同字母表示在 0.05 水平上差异不显著。花粉于 2004 年采集。Values followed by the same letter do not differ significantly at the P=0.05 (LSD test). Pollens were collected in 2004.

3 讨论

花粉生活力的测定方法主要有染色法、萌发法及授粉法等。林新春采用染色法对木兰科 5 种植物材料进行了花粉萌发率测定,萌发率均在 70% 以上^[4]。本试验采用液体培养基,二乔玉兰花粉在 5% 蔗糖+0.1% 硼酸和 5% 蔗糖+0.01% 硼酸两种培养液上,花粉萌发率均在 70% 以上。对于其他木兰科植物在该培养液上的萌发效果,还有待于进一步研究。

超低温技术是进行种质资源保存的一条新途径,它可以在不破坏植株体的前提下,实现植物种质的长期保存。有研究表明,保存 10 a 的桃(*Prunus persica*)花粉^[5]及保存了 10 a 以上的美国山核桃(*Carya illinoensis*)花粉^[6]仍具有生活力。本研究表明,随着保存时间的延长,超低温保存 2 a 的二乔玉

兰花花粉萌发率仍保持在 70% 以上,说明超低温是进行资源长期保存的最佳方法之一。

目前的研究认为,超低温保存花粉忍受反复冻存的能力与植物本身的特性及其含水量存在相关性。Koopowitz 等对唐菖蒲(*Gladiolus hybrida*)花粉的研究认为,干燥花粉在反复冻存 6 次后生活力降低,未干燥花粉在反复冻存 4 次后生活力降低^[9]。Sedgley 对鳄梨(*Persea americana*)花粉的超低温保存研究表明 2 次冻存对生活力造成损伤^[8]。Hughes 等认为反复冻存 3 次对耀花豆(*Clanthus formosus*)花粉的生活力影响不大^[9]。Sacks 等认为番茄(*Lycopersicon esculentum*)花粉的 2 次冻存不影响其生活力^[10]。Ganeshan 认为番木瓜(*Carica spp.*)花粉对反复冻存的忍受能力较高^[11]。本试验结果表明,二乔玉兰花粉在含水量为 21.9% 时经过 6 次反复冻存后生活力没有显著变化,与 Hughes 等的实验结果一致,由此看来,影响反复冻存效果的关键因子可能是植物材料本身的特性。

参考文献

- [1] Hu S Y (胡适宜). Pollen viability test from practical methods of plant embryology (I) [J]. Chin Bull Bot(植物学通报), 1993, 10(2): 60-62.(in Chinese)
- [2] Hu J(胡晋). Storage and viability test for pollen [J]. Seed(种子), 1992, (6):33-35.(in Chinese)
- [3] Chen J F (陈建勋), Wang X F (王晓峰). Plant Physiology Experiment Guidance [M]. Guangzhou: South China University of Technology Press, 2002. 2-3.(in Chinese)
- [4] Lin X C(林新春). Pollen viability of four species of Magnoliaceae [J]. Jiangxi For Sci Techn(江西林业科技), 2004. (4):4-5.(in Chinese)
- [5] Omura M, Akihama T A. Pollen preservation of fruit trees for genebanks in Japan [J]. Plant Gen Resour News Let, 1980, 43:28-31.
- [6] Sparks D, Yates I E. Pecan pollen stored over a decade retains viability [J]. Hortscience, 2002, 37(1):176-177.
- [7] Koopowitz H, Voss R, O'neil C. Long-term storage of *Gladiolus* pollen [J]. Hortscience, 1984, 19(4):513-514.
- [8] Sedgley M. Storage of avocado pollen [J]. Euphytica, 1981, 30: 595-599.
- [9] Hughes H G, Lee C W, Towill L E. Low-temperature preservation of *Clanthus formosus* pollen [J]. Hortscience, 1991, 26(11):1411-1412.
- [10] Sacks E J, Clair D A S. Cryogenic storage of tomato pollen: effect on fecundity [J]. Hortscience, 1996, 31(3):447-448.
- [11] Ganeshan S. Cryogenic preservation of papaya pollen [J]. Sci Hort, 1986, 28:65-70.