

桃品种‘八月香’花粉的超低温保存

宋尚伟*, 闫锋, 蔡艳婷, 苗红霞

河南农业大学林学院园艺学院, 郑州 450002

Cryopreservation of Pollen of ‘Bayuexiang’ Peach (*Prunus persica* L.)

SONG Shang-Wei*, YAN Feng, CAI Yan-Ting, MIAO Hong-Xia

College of Forestry and Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

摘要: 桃品种‘八月香’的花粉经4℃硅胶干燥8 h或(20±1)℃下玻璃化液PVS₄(35%甘油+20%乙二醇+0.6 mol·L⁻¹蔗糖)处理60 min后直接投入液氮保存,解冻后的萌发率都可以达到70%以上,萌发率与保存时间长短无关。

关键词: 花粉;干燥法;玻璃化法;超低温保存;桃

超低温保存技术是目前长期稳定保存植物种质资源中较为理想的方法,它是指在超低温(通常指液氮温度, -196℃)条件下,细胞的全部代谢活动近于完全停止,因而可以保持种质的遗传稳定性,达到长期保存的目的。自1973年Nag和Street首次在液氮中成功保存胡萝卜悬浮细胞以来,植物种质资源超低温保存已取得了突破性进展,许多植物材料如原生质体、愈伤组织、体细胞胚、胚、茎尖分生组织、芽、花粉等植物组织和器官采用超低温保存都取得成功(吴雪梅和汤浩茹2005)。植物花粉具有体积小、携带方便的特点,花粉用超低温保存技术可以不破坏种质资源,是种质资源保存的必要补充(王越和刘燕2006)。随着花粉单倍体育种、花粉遗传转化等工作的开展,对花粉保存的研究愈加受到重视。目前,已有柿和枇杷等10余种果树花粉采用超低温保存技术取得成功(艾鹏飞和罗正荣2004;王家福等2004),但对桃花粉玻璃化法超低温保存的研究尚未见报道。本实验对桃品种‘八月香’的花粉进行了超低温保存研究,以期能为桃花粉的种质保存,进而为花粉培养、遗传转化和杂交育种研究提供参考。

材料与amp;方法

材料来源于本校桃品种试验园,于晴天上午采集生长健壮的桃(*Prunus persica* L.)品种‘八月香’的成熟花粉,带回室内。用镊子摘除花药,平摊于硫酸纸上,室温下自然晾干20 h,收集散出的花粉,双层塑料薄膜包裹,置于4℃冰箱中

贮藏备用。花粉保存方法有以下2种。

(1)干燥法保存。于4℃条件下,将花粉等量放入2 mL冷冻管内,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(0、2、4、6、8、12、16 h)后,取出冷冻管,将不同处理时间的花粉分为两部分:一部分盖上冷冻管盖后投入液氮(-196℃)中保存,用不同温度和不同时间(4℃ 2 h、20℃ 30 min、40℃ 70 s)解冻后,分别检测花粉萌发率;另一部分不经液氮保存,作为对照。

(2)玻璃化法保存。于室温(20℃)条件下,将花粉等量装入2 mL冷冻管中,以改良的玻璃化液PVS₄(35%甘油+20%乙二醇+0.6 mol·L⁻¹蔗糖)(Sakai 2000)处理不同时间(0、10、20、40、60、80、100 min)后,一部分迅速投入液氮(-196℃)中保存,解冻(方法同上)后,以1.0 mol·L⁻¹蔗糖液洗涤2次,每次8 min,分别检测花粉的萌发率;以另一部分不经液氮保存的花粉为对照。

检测花粉萌发率时,干燥保存过的花粉,于室温和100%相对湿度下复水30 min,经玻璃化法保存过的花粉则取出后用蒸馏水洗去表面糖液,均匀散播于萌发培养基(15%蔗糖+1%琼脂)上,于25℃条件下恒温培养10 h后,显微镜观察统计花粉萌发百分数(花粉管长度大于花粉粒直径者为萌发花粉)。

收稿 2006-10-23 修定 2006-12-31
资助 河南省高校青年骨干教师资助计划(20020620)和河南省沙薄地综合治理科技专项(20040526)。

*E-mail: songshw@sina.com; Tel: 0371-63554959

实验结果

1 干燥时间对超低温保存后花粉萌发率的影响

从表1可以看出, 用干燥法干燥的花粉, 随着干燥处理时间的延长, 未经液氮保存的花粉萌发率逐渐降低, 而经液氮保存的花粉生活力则先升高后降低, 其中干燥8 h时的萌芽率最高, 为85%, 这与前人在柿中的结果一致(艾鹏飞和罗正荣2004)。由此也可以看出, 不同植物的花粉超低温保存的适宜含水量是有差异的, 所以找出适宜含水量所需要的脱水时间是干燥法保存时的重要环节。因此认为桃品种‘八月香’花粉的适宜干燥脱水时间应是8 h左右。

表1 干燥时间对桃品种‘八月香’花粉萌发率的影响

干燥时间/h	花粉萌发率/%	
	未经液氮保存	液氮保存
0	90.3 ^a	65.5 ^d
2	90.2 ^a	67.6 ^d
4	89.1 ^{ab}	74.7 ^c
6	88.4 ^{bc}	82.3 ^{ab}
8	87.2 ^{cd}	85.5 ^a
12	84.6 ^d	80.7 ^b
16	79.6 ^e	74.1 ^c

采用Duncan检测方法($P=0.05$), 字母相同者表示差异不显著, 字母不同者表示差异显著。

2 PVS₄处理时间对超低温保存后花粉萌发率的影响

表2显示经玻璃化法处理的桃花粉, 随着处理时间的延长, 未经液氮保存的花粉萌发率逐渐降低, 而经液氮保存的花粉生活力则先降低后升高, 随之又降低, 其中处理60 min的萌芽率达到70%以上。其原因可能是保护剂处理时间过短, 材料脱水不够, 降温过程中不能迅速达到玻璃化状态, 因而花粉萌发率下降所致, 但处理时间过长, 花粉则可能由于受到玻璃化液的毒害, 萌发率反而有所降低, 因而对桃品种‘八月香’的花粉来说, 适宜的玻璃化液处理时间应以室温下处理60 min为宜。

3 解冻方式对超低温保存后花粉活力的影响

如图1所示, 保存方法不同, 桃品种‘八

表2 PVS₄处理时间对桃品种‘八月香’花粉萌发率的影响

处理时间/min	花粉萌发率/%	
	未经液氮保存	液氮保存
0	90.3 ^a	65.1 ^b
10	84.5 ^b	55.2 ^c
20	81.2 ^c	56.1 ^c
40	79.7 ^{cd}	67.5 ^b
60	76.5 ^d	72.7 ^a
80	67.4 ^e	54.4 ^c
100	56.4 ^f	32.2 ^d

采用Duncan检测方法($P=0.05$), 字母相同者表示差异不显著, 字母不同者表示差异显著。

月香’花粉超低温保存后所需的解冻方法也不同。低温(4 °C) 2 h、室温(20 °C) 30 min和高温(40 °C) 70 s化冻后, 干燥法干燥的超低温保存后的花粉萌发率都可以达到80%以上, 而玻璃化法处理的超低温保存后的花粉则对解冻温度和时间比较敏感, 其中以40 °C解冻70 s的萌发效果最好, 20 °C次之, 4 °C的效果最差。化冻方式是超低温保存研究中的关键步骤, 不同植物材料超低温保存后最佳化冻方式不同(徐艳等2006)。因此对桃品种‘八月香’花粉来说, 要获得高的萌发率, 玻璃化法保存后以40 °C解冻70 s的解冻方式最适宜, 而干燥法保存后上述3种化冻方式都比较合适。

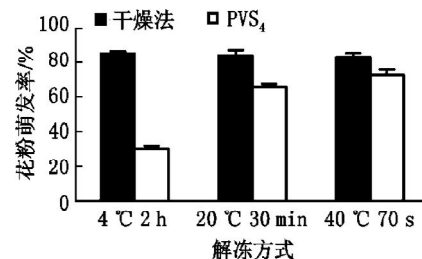


图1 解冻方式对桃品种‘八月香’花粉超低温保存后萌发率的影响

4 贮藏时间对超低温保存后花粉活力的影响

从表3可以看出, 桃品种‘八月香’花粉在液氮(-196 °C)超低温条件下保存不同时间的萌发率没有显著变化, 说明此种保存方法对保存植物花粉是比较适宜的。

表3 贮藏时间对桃品种‘八月香’花粉萌发率的影响

保存时间/d	花粉萌发率/%	
	干燥法保存	玻璃化法保存
1	85.5 ^a	72.7 ^a
10	84.2 ^a	71.9 ^a
30	82.6 ^a	71.4 ^a
60	83.1 ^a	71.3 ^a

采用 Duncan 检测方法 ($P=0.05$), 字母相同者表示差异不显著, 字母不同者表示差异显著。

讨 论

保护剂的作用机制是其可增大膜对水分的通透性, 促进细胞外冰冻造成的脱水效果, 降低细胞内水冰点温度, 保护蛋白质和酶类, 因此选好冰冻保护剂是保证细胞进行超低温保存的关键, 保护剂的选择和浓度以及几种保存剂的配合方式对细胞存活有很大影响(梁永恒等 1999; 苗琦等 2005)。本实验中 PVS₄ 处理可减少传统保存方法中采用二甲基亚砷(DMSO)对花粉的伤害, 同样有较好的保存效果, 这种保护剂能否用于保存更多植物的花粉仍待进一步研究。从我们的实验结

果来看, 玻璃化法保存花粉因有保护剂的存在, 对花粉有一定伤害作用, 保存后有部分花粉死亡, 花粉萌发率降低。而干燥脱水法保存花粉的操作简便易行, 且保存效果更好, 似乎更有实际应用价值。

参考文献

- 艾鹏飞, 罗正荣(2004). 柿品种‘禅寺丸’花粉超低温保存研究. 华中农业大学学报, 23 (5): 563~565
- 梁永恒, 黄上志, 傅家瑞(1999). 植物种质资源的保存. 植物生理学通讯, 35 (3): 244~250
- 苗琦, 谷运红, 王卫东, 秦文雍(2005). 植物组织培养物的超低温保存. 植物生理学通讯, 41 (3): 350~353
- 王家福, 刘月学, 刘小军, 林顺权(2004). 枇杷花粉干冻法超低温保存研究. 中国农学通报, 20 (1): 1~2
- 王越, 刘燕(2006). 观赏植物种质资源的超低温保存. 植物生理学通讯, 42 (3): 559~566
- 吴雪梅, 汤浩茹(2005). 包埋玻璃化法超低温保存植物种质的研究进展. 植物学通报, 22 (2): 238~245
- 徐艳, 刘燕, 石雷(2006). 大叶黑桫椤孢子超低温保存. 植物生理学通讯, 42 (1): 55~57
- Sakai A (2000). Development of cryopreservation techniques. In: Engelmann F, Takagi H (eds). Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application. Tsukuba, Japan: Japan International Research Center for Agriculture Sciences, 1~7