

# 桃花粉低温和超低温保存方法比较研究

张金梅<sup>1</sup>, 闫文君<sup>1</sup>, 李 雪<sup>1</sup>, 黄 斌<sup>1,2</sup>, 张海晶<sup>1</sup>, 赵剑波<sup>3</sup>, 姜 全<sup>3</sup>, 陈晓玲<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; <sup>2</sup> 福建农林大学, 福州 350002; <sup>3</sup> 北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100097)

**摘要:**桃(*Prunus persica* (L.) Batsch)是我国重要的无性繁殖作物种质资源,目前主要保存于3个国家无性繁殖作物种质圃。随着以茎尖、花粉、休眠芽为保存载体的超低温保存技术的发展,超低温保存已成为无性繁殖作物重要备份保存方式。本研究以15份桃种质花粉为研究对象,开展含水量、回湿处理和保存温度(4℃低温保存和液氮超低温保存)对保存后花粉离体萌发率的影响研究。研究结果:明确了桃种质花粉超低温保存的含水量;揭示了回湿处理对部分桃种质花粉超低温保存产生显著影响;超低温保存后花粉离体萌发率最高可达83%;4℃低温保存和超低温保存比较研究结果表明,超低温保存4年后14份桃种质花粉离体萌发率仍可保持30%以上,11份桃种质花粉离体萌发率与保存前花粉离体萌发率相比无显著变化甚至显著提高,而4℃低温保存的花粉离体萌发率降至0。该研究为国家种质库建立花粉规模化超低温保存提供技术支持。

**关键词:**桃;花粉;4℃低温保存;超低温保存;离体萌发;监测

## Study on Low Temperature Storage and Cryopreservation of Pollen for Peach Germplasm Resources

ZHANG Jin-mei<sup>1</sup>, YAN Wen-jun<sup>1</sup>, LI Xue<sup>1</sup>, HUANG Bin<sup>1,2</sup>, ZHANG Hai-jing<sup>1</sup>,  
ZHAO Jian-bo<sup>3</sup>, JIANG Quan<sup>3</sup>, CHEN Xiao-ling<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; <sup>2</sup> Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002; <sup>3</sup> Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097)

**Abstract:** Peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) is one of the most important vegetatively propagated crop germplasm resources in China. Cryopreservation has been implemented in genebanks worldwide to conserve vegetatively propagated plant collections by using shoot tips, pollen or dormant buds. In this study, the effects of moisture content, rehydration treatment and storage temperature (4℃ and cryopreservation) on *in vitro* germination levels of pollen after storage were investigated for 15 peach cultivars. Results showed that: the moisture content for peach pollen cryopreservation were determined, and the optimal rehydration condition was found to be cultivar-dependent. *In vitro* germination levels of peach pollen after cryopreservation were as high as 80% after 4 years storage. Furthermore, *in vitro* germination levels of peach pollen after cryopreservation (*in vitro* germination levels were higher than 30% for 14 cultivars) were significantly higher than those stored under 4℃ low temperature (*in vitro* germination levels of 0). And *in vitro* germination levels of pollen for 11 cultivars after 4 years cryopreservation were not changed significantly, even 5 cultivars among them obtained significantly higher *in vitro* germination levels. In conclusion, this study will benefit for the establishment of pollen large scale cryopreservation for the new National Crop Genebank of China in future.

**Key words:** peach; pollen; low temperature storage; cryopreservation; *in vitro* germination; monitoring

收稿日期: 2016-10-24 修回日期: 2016-11-24 网络出版日期: 2017-06-13

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170613.0859.022.html>

**基金项目:** 国家国际科技合作专项 (2014DFG31860); 农作物种质资源保护与利用专项课题 (2016NWB036-09); “十二五”科技支撑计划 (2013BAD01B01); 中国农业科学院科技创新工程/作物种质资源保护与共享团队 (CAAS-ASTIP-2016-ICS)

第一作者研究方向为作物种质资源保存。E-mail: zhangjinmei@caas.cn

通信作者: 陈晓玲, 研究方向为作物种质资源保存。E-mail: chenxiaoling@caas.cn

桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 是蔷薇科李属落叶乔木。我国作为桃种质起源中心,拥有 4000 多年的栽培历史以及遗传多样性丰富的种质资源<sup>[1]</sup>。由于桃的经济价值以及其自花授粉特性,桃已成为蔷薇科模式植物和种质资源研究热点<sup>[2]</sup>。与大部分无性繁殖作物种质保存方式相同,桃种质主要以种质资源圃形式保存。我国自 20 世纪 50 年代开始进行桃种质资源调查与收集保存工作,80 年代分别在北京、南京、郑州建立了 3 个国家桃种质资源圃,截至 2015 年底已分别入圃保存桃种质资源 485、645 和 800 份。据报道美国农业部国家无性繁殖种质圃—戴维斯(The National Clonal Germplasm Repository in Davis, CA, USDA-ARS)已保存桃种质资源 595 份<sup>[3]</sup>。种质圃保存有利于种质繁殖更新和种质分发交换,但也存在着劳动成本高、极端天气及病虫害等威胁。随着超低温保存技术的发展,植物种质资源超低温保存取得了突破性进展,成为无性繁殖作物种质资源的重要备份保存方式<sup>[4]</sup>。

超低温保存是将植物组织在液态氮(−196 ℃)或气态氮(−150 ℃)中进行长期保存,保存载体涉及花粉、茎尖、休眠芽、愈伤组织等<sup>[5-7]</sup>。花粉的长期安全保存,可有效解决杂交育种中可能出现的父母本花期不遇的问题;同时,可为花粉培养、遗传转化和杂交育种研究提供技术支撑<sup>[8-10]</sup>。据统计,国内外已对包括主要农作物、果树、蔬菜、园林植物、经济作物、药用作物以及经济林木等 170 多种植物开展了花粉超低温保存技术研究<sup>[11-21]</sup>,同时也有利用超低温保存的花粉成功用于杂交育种研究的报道<sup>[9,22]</sup>。

国内外以桃种质为研究对象开展的花粉超低温保存研究较早<sup>[23-24]</sup>,如 M. Omura 等<sup>[24]</sup>报道了日本国家种质库(The National Institute of Agrobiological Sciences, NIAS)超低温保存了 60 份桃种质花粉;我国学者开展了八月香、晚丰 18 号、艳红桃等桃种质花粉超低温保存技术研究,发现经干燥脱水法超低温保存后花粉萌发率最高可分别达 85.5%、65.5% 和 81.6%<sup>[25-27]</sup>。以往研究中报道了花粉干燥的处理条件和时间,但对适宜超低温保存的含水量没有明确报道。由于缺乏详细的初始含水量、干燥含水量等数据,可能会造成实验室间技术难以转移,实验结果较难重复<sup>[28]</sup>。同时,且国内尚未开展桃种质花粉超低温保存规模化实践研究。

中国农业科学院作物科学研究所国家作物种质库一直从事无性繁殖作物离体保存研究,在以茎尖、

休眠芽、花粉等为保存载体的无性繁殖作物超低温保存技术研发和优化方面取得显著进展<sup>[29-37]</sup>。本研究以 15 份桃种质花粉为研究对象,利用干燥脱水超低温保存方法,开展以下研究:(1)含水量对桃花粉超低温保存的影响研究;(2)超低温保存化冻后回湿处理对桃花粉离体萌发率的影响研究;(3)4 ℃低温保存和液氮超低温保存后花粉离体萌发率的比较研究;(4)4 ℃低温保存和液氮超低温保存 4 年后花粉离体萌发率监测研究。本研究旨为国家种质库建立花粉规模化超低温保存提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究所用的 15 份桃种质花粉样品,均采集于北京市农林科学院林业果树研究所国家桃种质资源圃。15 份桃种质分别为:92-7-10、94-1-40、94-2-42、94-6-6、97-3-29、BR1、G、G-12、T-25、花桃 3、花桃 6、瑞蟠 5 号、新疆毛桃、意大利 5 号和早霞露。

### 1.2 方法

**1.2.1 材料采集** 花蕾于晴天 9:00-11:00 采集,放入袋中,带回中国农业科学院作物科学研究所国家作物种质库(北京,中国)实验室进行后续实验。

**1.2.2 花粉干燥脱水超低温保存** 花粉干燥脱水超低温保存流程主要包括以下步骤:(1)室内剥取花药,置于硫酸纸上散粉;(2)将花药置于室温干燥(温度  $22 \pm 2$  ℃,相对湿度 20%~30%),测定干燥后含水量;(3)将干燥后的花药密封包装于 1.8 mL 冻存管(Nunc,美国)中,投入国家作物种质库的液氮罐(CBS S3000-AB SERIES,美国)保存;(4)将装有样品的冻存管从液氮中取出,在 38 ℃水浴中化冻 3~5 min;(5)取化冻后的花药于安培瓶中,将安培瓶置于含有过饱和硫酸铜的密闭容器中,室温下回湿 2~3 h。

其中含水量的测定方法为:干燥安培瓶及瓶盖,称量得数据 Ma;放入样品后再称量,得数据 Mb。敞开瓶盖放置于 130 ℃烘箱内烘干 2 h。取出后盖紧盖子,置于干燥器中室温冷却 20~30 min,再称量得数据 Mc。根据计算公式获得含水量,即含水量 =  $[\text{烘前总重量}(\text{Mb}) - \text{烘后总重量}(\text{Mc})] / [\text{烘前样品重量}(\text{Mb} - \text{Ma})]$ 。每次测定 3 次重复。

**1.2.3 花粉 4 ℃低温保存** 将方法 1.2.2 中步骤(1)和(2)处理后的花药密封包装于 1.8 mL 冻存管后,置于国家作物种质库的 4 ℃冰箱(海尔,北京)保存处理。回湿处理时按方法 1.2.2 中步骤(5)处理。

**1.2.4 花粉存活离体萌发测定** 利用悬滴离体萌发法进行花粉存活离体萌发率测定:(1)将花粉置于含有 150 g/L 蔗糖和 100 mg/L 硼酸的离体萌发液体培养基上,25 ℃暗培养 4~8 h;(2)花粉离体萌发后,利用显微镜(SZ × 16, OLYMPUS, 日本)照相并统计离体萌发率。统计时,萌发的花粉管长度超过花粉粒直径 1 倍视为有生命力的花粉,每次随机选取 4 个视野,平均每个视野约 100 个花粉,每组做 4 个重复。

**1.2.5 数据统计分析** 花粉萌发率以平均值和标准方差表示。利用 SPSS 软件 18.0 进行数据分析,应用最小显著极差法(Least Significant Difference, LSD)进行方差分析(ANOVA)或进行 *T* 检验( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),以获得数据显著性差异的分析结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 含水量对超低温保存花粉离体萌发率的影响

将 15 份桃种质花药干燥至不同含水量后进行干燥脱水超低温保存,统计超低温保存后花粉离体萌发率,以研究不同含水量对超低温保存后花粉离体萌发率的影响。

研究表明,当花药尚未散粉完全时,即花药平均含水量为 56.4% 以上时,超低温保存后花粉平均萌发率均为 0;当花药含水量干燥至 33.7%~37.3% 时,5 份桃种质花粉(92-7-10、94-1-40、97-3-29、新疆毛桃和早霞露)超低温保存后花粉平均萌发率分别为 65.5%、57.5%、56.2%、58.3% 和 48.1%;当花药含水量干燥至 25.2%~26.6% 时,3 份桃种质(94-1-40、97-3-29 和新疆毛桃)超低温保存后花粉离体萌发率分别为 83.3%、68.9% 和 79.2%;当花药含水量干燥至 13.3%~20.6% 时,6 份种质(94-1-40、BR1、G、花桃 6、瑞蟠 5 号和早霞露)超低温保存后花粉离体萌发率分别为 83.0%、43.6%、47.2%、50.4%、43.7% 和 70.2%;而 3 份种质(94-6-6、花桃 3 和意大利 5 号)超低温保存后花粉离体萌发率较低,分别为 28.6%、28.0% 和 25.5%;当花药含水量干燥至 11.4% 以下时,4 份种质(92-7-10、94-2-42、94-6-6 和意大利 5 号)超低温保存后花粉离体萌发率分别为 61.3%、51.1%、40.0% 和 42.9%;7 份种质(94-1-40、G-12、T-25、花桃 3、花桃 6、瑞蟠 5 号和新疆毛桃)超低温保存后花粉离体萌发率相对较低,分别为 34.5%、22.8%、32.8%、6.0%、26.5%、12.0% 和 5.7% (表 1)。

表 1 含水量对超低温保存桃花粉离体萌发率的影响

Table 1 Effect of pollen moisture content on *in vitro* germination levels of peach pollen after cryopreservation

| 序号<br>No. | 品种<br>Cultivar | 花药含水量(%)<br>Moisture content<br>of anther                         | 超低温保存后花粉<br>离体萌发率(%)<br><i>In vitro</i> germination<br>levels of pollen after<br>cryopreservation |
|-----------|----------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1         | 92-7-10        | 67.8 ± 2.2<br>36.2 ± 0.8<br>9.3 ± 1.7                             | 0 b<br>65.5 ± 2.4 a<br>61.3 ± 8.9 a                                                               |
| 2         | 94-1-40        | 61.5 ± 0.6<br>33.7 ± 2.3<br>26.6 ± 1.3<br>17.6 ± 1.1<br>7.7 ± 1.6 | 0 d<br>57.5 ± 8.8 b<br>83.3 ± 0.9 a<br>83.0 ± 4.9 a<br>34.5 ± 4.8 c                               |
| 3         | 94-2-42        | 70.1 ± 1.4<br>5.0 ± 0.8                                           | 0<br>51.1 ± 6.6 **                                                                                |
| 4         | 94-6-6         | 64.6 ± 0.7<br>18.4 ± 2.2<br>9.6 ± 6.3                             | 0 c<br>28.6 ± 7.9 b<br>40.0 ± 3.2 a                                                               |
| 5         | 97-3-29        | 66.8 ± 2.6<br>34.0 ± 8.6<br>25.2 ± 2.8                            | 0 c<br>56.2 ± 1.4 b<br>68.9 ± 4.8 a                                                               |
| 6         | BR1            | 56.4 ± 2.9<br>17.3 ± 1.0                                          | 0<br>43.6 ± 9.5 **                                                                                |
| 7         | G              | 67.6 ± 1.6<br>14.4 ± 3.5                                          | 0<br>47.2 ± 2.8 **                                                                                |
| 8         | G-12           | 70.6 ± 3.2<br>11.4 ± 9.3                                          | 0<br>22.8 ± 6.8 **                                                                                |
| 9         | T-25           | 61.5 ± 3.3<br>8.6 ± 2.3                                           | 0<br>32.8 ± 4.1 **                                                                                |
| 10        | 花桃 3           | 69.0 ± 0.8<br>38.0 ± 3.7<br>13.3 ± 0.8<br>7.9 ± 1.8               | 0 c<br>0 c<br>28.0 ± 3.5 a<br>6.0 ± 1.2 b                                                         |
| 11        | 花桃 6           | 65.5 ± 3.4<br>14.6 ± 1.3<br>10.7 ± 1.7                            | 0 c<br>50.4 ± 2.6 a<br>26.5 ± 8.8 b                                                               |
| 12        | 瑞蟠 5 号         | 64.4 ± 1.5<br>20.6 ± 2.6<br>10.3 ± 1.2                            | 0 c<br>43.7 ± 7.6 a<br>12.0 ± 2.0 b                                                               |
| 13        | 新疆毛桃           | 64.3 ± 1.4<br>37.3 ± 4.8<br>26.1 ± 4.9<br>8.1 ± 2.7               | 0 c<br>58.3 ± 8.6 b<br>79.2 ± 2.3 a<br>5.7 ± 0.9 c                                                |
| 14        | 意大利 5 号        | 63.6 ± 1.0<br>13.9 ± 2.2<br>7.4 ± 2.0                             | 0 c<br>25.5 ± 3.2 b<br>42.9 ± 6.4 a                                                               |
| 15        | 早霞露            | 65.9 ± 1.0<br>36.7 ± 0.9<br>17.7 ± 2.9                            | 0 c<br>48.1 ± 4.1 b<br>70.2 ± 9.2 a                                                               |

表格内数据为平均值 ± 标准差;字母代表存在差异显著性(LSD);

\* 和 \*\* 分别表示经 *T* 检验差异显著和极显著( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )

Values are means and standard errors of four replicates, letters indicate the significant differences of the results by LSD test, \* and \*\* denote significant differences of the results at 0.05 level or 0.01 level (*T* test)



## 2.2 保存温度和回湿处理对保存后花粉离体萌发率的影响

以 13 份桃种质为对象,通过干燥脱水处理,分别于 4 ℃ 低温和液氮超低温保存 1 个月。取出化冻后进行花粉离体萌发率测定,结果如表 2 所示。研究结果表明,超低温保存效果显著高于 4 ℃ 低温保存。11 份桃种质花粉,即 92-7-10、94-1-40、94-2-42、97-3-29、G、G-12、花桃 3、花桃 6、瑞蟠 5 号、新疆毛桃和早霞露品种,超低温保存 1 个月后花粉离体萌发率(28.0% ~ 83.3%)显著高于 4 ℃ 低温保存 1 个月后花粉离体萌发率(0 ~ 31.7%);2 份桃种质(T-25 和意大利 5 号品种)花粉超低温保存后和 4 ℃ 低温保存后离体萌发率无显著差别。与保存前花粉离体萌发率相比,经超低温保存后,9 份种质即 92-7-10、94-1-40、94-2-42、G、T-25、花桃 3、花桃 6、新疆毛桃和早霞露花粉离体萌发率显著增加;5 份种质即 94-6-6、97-3-29、BR1、G-12、瑞蟠 5 号花粉离体萌发率与保存前无显著变化;仅 1 份种质花粉显著降低。而经 4 ℃ 低温保存后,与保存前花粉

离体萌发率相比,9 份种质花粉离体萌发率显著降低。

以 15 份桃种质花粉为研究对象,采用干燥脱水超低温保存 4 年后,开展回湿处理对超低温保存后花粉离体萌发率的影响研究,结果如表 2 所示。研究结果表明,回湿处理对部分桃种质超低温保存花粉离体萌发率具有显著影响,存在品种特异性。8 份种质超低温保存化冻后增加回湿处理的花粉离体萌发率比未进行回湿处理的花粉离体萌发率显著提高 12% ~ 24%,即 92-7-10 从 26.8% 提高到 41.9%,94-2-42 从 16.8% 提高到 34.5%,G-12 从 15.3% 提高到 34.9%,T-25 从 42.4% 提高到 63.4%,花桃 3 从 19.8% 提高到 34.2%,花桃 6 从 39.3% 提高到 63.2%,瑞蟠 5 号从 31.2% 提高到 48.1%,意大利 5 号从 39.5% 提高到 51.7%;而 97-3-29 和早霞露 2 份种质超低温保存化冻后增加回湿处理的花粉离体萌发率比未回湿处理的显著降低,即分别从 48.8% 降低至 37.2%,41.3% 降低至 21.9%;其余 5 份种质花粉超低温保存后增加回湿处理对花粉离体萌发率影响不显著。

表 2 保存温度和回湿处理对花粉离体萌发率的影响

Table 2 Effects of the storage temperature and rehydration treatment on *in vitro* germination levels of peach pollen after storage

| 序号<br>No. | 品种<br>Cultivar | 花药含水量(%)<br>Moisture content<br>of anther | 保存前花粉离<br>体萌发率(%)                                                    | 保存 1 个月后花粉离体萌发率(%)                                                        |                                          | 保存 4 年后花粉离体萌发率(%)                                                         |                  |                                         |                                          |
|-----------|----------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|
|           |                |                                           | <i>In vitro</i><br>germination<br>levels of pollen<br>before storage | <i>In vitro</i> germination levels of<br>pollen after storage for 1 month |                                          | <i>In vitro</i> germination levels of<br>pollen after storage for 4 years |                  |                                         |                                          |
|           |                |                                           |                                                                      | 4 ℃ <sup>NR</sup>                                                         | LN <sup>NR</sup>                         | 4 ℃ <sup>NR</sup>                                                         | 4 ℃ <sup>R</sup> | LN <sup>NR</sup>                        | LN <sup>R</sup>                          |
| 1         | 92-7-10        | 36.2 ± 0.8                                | 28.1 ± 3.5                                                           | 0 <sup>#</sup>                                                            | 65.5 ± 2.4 <sup>**</sup> , <sup>##</sup> | 0 <sup>#</sup>                                                            | 0 <sup>#</sup>   | 26.8 ± 4.2                              | 41.9 ± 2.1 <sup>**</sup> , <sup>##</sup> |
| 2         | 94-1-40        | 26.6 ± 1.3                                | 46.3 ± 7.2                                                           | 1.2 ± 1.2 <sup>##</sup>                                                   | 83.3 ± 0.9 <sup>**</sup> , <sup>##</sup> | 0 <sup>#</sup>                                                            | 0 <sup>#</sup>   | 39.7 ± 5.2                              | 42.7 ± 4.6                               |
| 3         | 94-2-42        | 5.0 ± 0.8                                 | 27.9 ± 3.3                                                           | 6.4 ± 2.7 <sup>##</sup>                                                   | 51.1 ± 6.6 <sup>**</sup> , <sup>##</sup> | 0 <sup>#</sup>                                                            | 0 <sup>#</sup>   | 16.8 ± 1.2 <sup>##</sup>                | 34.5 ± 2.2 <sup>**</sup> , <sup>#</sup>  |
| 4         | 94-6-6         | 9.6 ± 6.3                                 | 35.7 ± 4.9                                                           | /                                                                         | 40.0 ± 3.2                               | 0 <sup>#</sup>                                                            | 0 <sup>#</sup>   | 28.4 ± 1.4                              | 30.7 ± 1.1                               |
| 5         | 97-3-29        | 25.2 ± 2.8                                | 66.7 ± 16.7                                                          | 26.7 ± 1.7 <sup>#</sup>                                                   | 68.9 ± 4.8 <sup>**</sup>                 | 0 <sup>#</sup>                                                            | 0 <sup>#</sup>   | 48.8 ± 1.5 <sup>**</sup>                | 37.2 ± 0.3 <sup>#</sup>                  |
| 6         | BR1            | 17.3 ± 1.0                                | 40.2 ± 8.4                                                           | /                                                                         | 43.6 ± 9.5                               | 0 <sup>#</sup>                                                            | 0 <sup>#</sup>   | 8.8 ± 3.6 <sup>##</sup>                 | 8.5 ± 2.5 <sup>##</sup>                  |
| 7         | G              | 14.4 ± 3.5                                | 37.0 ± 3.3                                                           | 31.7 ± 2.5                                                                | 47.2 ± 2.3 <sup>**</sup> , <sup>#</sup>  | 0 <sup>#</sup>                                                            | 0 <sup>#</sup>   | 15.5 ± 7.1 <sup>##</sup>                | 30.4 ± 14.7                              |
| 8         | G-12           | 11.4 ± 9.3                                | 22.8 ± 6.8                                                           | 21.0 ± 0.3                                                                | 23.7 ± 1.4 <sup>*</sup>                  | 0 <sup>#</sup>                                                            | 0 <sup>#</sup>   | 15.3 ± 2.2                              | 34.9 ± 4.5 <sup>**</sup>                 |
| 9         | T-25           | 8.6 ± 2.3                                 | 20.9 ± 2.9                                                           | 37.5 ± 11.7 <sup>#</sup>                                                  | 32.9 ± 4.1 <sup>##</sup>                 | 0 <sup>#</sup>                                                            | 0 <sup>#</sup>   | 42.4 ± 2.2 <sup>##</sup>                | 63.4 ± 4.7 <sup>**</sup> , <sup>##</sup> |
| 10        | 花桃 3           | 13.3 ± 0.8                                | 22.0 ± 1.7                                                           | 18.0 ± 2.3 <sup>#</sup>                                                   | 28.0 ± 3.5 <sup>**</sup> , <sup>##</sup> | 0 <sup>#</sup>                                                            | 0 <sup>#</sup>   | 19.8 ± 2.9                              | 34.2 ± 3.9 <sup>**</sup> , <sup>##</sup> |
| 11        | 花桃 6           | 14.6 ± 1.3                                | 20.8 ± 7.6                                                           | 23.5 ± 0.5                                                                | 50.4 ± 2.6 <sup>**</sup> , <sup>##</sup> | 0 <sup>#</sup>                                                            | 0 <sup>#</sup>   | 39.3 ± 5.3 <sup>#</sup>                 | 63.2 ± 0.6 <sup>**</sup> , <sup>##</sup> |
| 12        | 瑞蟠 5 号         | 20.6 ± 2.6                                | 47.1 ± 12.0                                                          | 21.7 ± 3.9 <sup>##</sup>                                                  | 43.7 ± 7.6 <sup>**</sup>                 | 0 <sup>#</sup>                                                            | 0 <sup>#</sup>   | 31.2 ± 1.3                              | 48.1 ± 2.5 <sup>**</sup>                 |
| 13        | 新疆毛桃           | 26.1 ± 4.9                                | 48.1 ± 4.4                                                           | 17.6 ± 2.1 <sup>##</sup>                                                  | 79.2 ± 2.3 <sup>**</sup> , <sup>##</sup> | 0 <sup>#</sup>                                                            | 0 <sup>#</sup>   | 40.4 ± 2.4                              | 42.4 ± 1.1                               |
| 14        | 意大利 5 号        | 7.4 ± 2.0                                 | 57.7 ± 2.5                                                           | 35.5 ± 3.3 <sup>##</sup>                                                  | 42.9 ± 6.4 <sup>##</sup>                 | 0 <sup>#</sup>                                                            | 0 <sup>#</sup>   | 39.5 ± 4.8 <sup>##</sup>                | 51.7 ± 0.4 <sup>*</sup> , <sup>#</sup>   |
| 15        | 早霞露            | 17.7 ± 2.9                                | 49.2 ± 4.5                                                           | 0 <sup>#</sup>                                                            | 70.2 ± 9.2 <sup>**</sup> , <sup>##</sup> | 0 <sup>#</sup>                                                            | 0 <sup>#</sup>   | 41.3 ± 3.1 <sup>**</sup> , <sup>#</sup> | 21.9 ± 2.5 <sup>##</sup>                 |

表格内数据为平均值 ± 标准差;LN 表示花粉经液氮保存;NR 和 R 分别表示花粉保存后未经回湿处理和经回湿处理;\* 和 \*\* 分别表示经 *T* 检验差异显著和极显著( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),用于保存 1 个月后进行 4 ℃ 和超低温保存后花粉离体萌发率差异显著性分析,以及保存 4 年后进行超低温保存后未回湿处理和回湿处理的花粉离体萌发率差异显著性分析;# 和 ## 分别表示经 *T* 检验差异显著和极显著( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),用于保存后和保存前花粉离体萌发率差异显著性分析

Values are means and standard errors of four replicates; LN indicated storage in the liquid nitrogen; NR and R indicated that pollen treated without rehydration, and with rehydration, respectively. \* and \*\* denote significant differences of the results at 0.05 level or 0.01 level(*T* test), in which the *T* test of *in vitro* germination levels of pollen was conducted between 4 ℃ storage and cryopreservation after 1 month, and also conducted between without rehydration and with rehydration treatments after 4-year cryopreservation. # and ## also denote significant differences of the results at 0.05 level or 0.01 level(*T* test), in which the *T* test of *in vitro* germination levels of pollen was conducted between after and before 4 ℃ storage or cryopreservation

### 2.3 保存 4 年后花粉离体萌发率监测

以 15 份桃种质花粉为研究对象,测定 4 ℃ 低温保存和液氮超低温保存 4 年后的花粉离体萌发率,结果如表 2 所示。研究表明,15 份桃种质花粉经 4 ℃ 低温保存 4 年后,化冻后未增加和增加回湿处理的花粉离体萌发率均降至 0;而在超低温条件下保存的花粉仍具有活力。与保存前花粉离体萌发率相比,超低温保存 4 年后通过增加化冻后回湿处理,5 份种质(即 92-7-10、94-2-42、T-25、花桃 3 和花桃 6)花粉离体萌发率显著提高;6 份种质(即 94-1-40、94-6-6、G、G-12、瑞蟠 5 号、新疆毛桃)花粉离体萌发率与保存前无显著变化;4 份种质(即 97-3-29、BR1、意大利 5 号和早霞露)花粉离体萌发率显著降低。14 份种质(除 BR1 品种外)超低温保存 4 年后其花粉离体萌发率仍可保持 30% 以上。

## 3 讨论

花粉含水量是超低温保存的关键影响因素。国内外以往对桃花粉超低温保存技术报道中,明确了干燥时间(如 8 h 或 24 h),但没有明确适宜的含水量范围<sup>[24-25,27]</sup>。基于本研究结果,我们建议 5 份桃种质,即 92-7-10、94-1-40、97-3-29、瑞蟠 5 号 and 新疆毛桃,用于超低温保存的花药可干燥至含水量 20.6% ~ 36.2%;6 份种质,即 BR1、G、G-12、花桃 3、花桃 6 和早霞露,可干燥至含水量 11.4% ~ 17.7%;4 份种质,即 94-2-42、94-6-6、T-25 和意大利 5 号,可干燥至含水量 5.0% ~ 9.6%。94-1-40 经超低温保存 1 个月后花粉离体萌发率最高可达 80%,该结果与宋尚伟等<sup>[25]</sup>、宋常美等<sup>[27]</sup>研究报道的八月香和艳红桃品种花粉超低温保存离体萌发率相似。不同桃品种花粉超低温保存出现的品种特异性,在已报道的柑橘和椰子花粉超低温保存研究中也同样发现<sup>[18,38]</sup>。

E. Parton 等<sup>[39]</sup>研究表明,化冻后增加回湿处理对凤梨科植物花粉超低温保存存在显著影响。本研究表明,回湿处理对部分桃种质离体萌发率具有显著影响,存在品种特异性。如 8 份种质(即 92-7-10、94-2-42、T-25、G-12、花桃 3、花桃 6、瑞蟠 5 号和意大利 5 号)花粉经回湿处理后比未进行回湿处理的离体萌发率显著提高;2 份种质(97-3-29 和早霞露)花粉经回湿处理后比未进行回湿处理的离体萌发率显著降低;其余 5 份种质(94-1-40、94-6-6、BR1、G 和新疆毛桃)两种处理花粉离体萌发率差异不显著。

有研究学者对芍药、辣椒、玉兰、山茶、扁桃等花粉超低温保存研究表明,花粉经超低温保存后仍具有较高的生活力<sup>[40-44]</sup>。对荔枝<sup>[45]</sup>、猕猴桃<sup>[46]</sup>、枣<sup>[47]</sup>、石斛兰<sup>[48]</sup>等种质花粉在 4 ℃、-20 ℃、液氮保存比较研究发现,花粉超低温保存显著延长了花粉保存寿命。本研究通过 15 份桃种质花粉在超低温保存和 4 ℃ 低温保存 1 个月后离体萌发率的比较研究发现,11 份种质花粉超低温保存的花粉离体萌发率显著高于 4 ℃ 保存的花粉离体萌发率。从保存 4 年后的花粉离体萌发率监测结果发现,4 ℃ 保存的花粉均丧失活力;而超低温保存的 11 份种质桃花粉离体萌发率与保存前花粉离体萌发率相比无显著变化甚至显著提高,14 份种质花粉的离体萌发率仍保持 30% 以上。据报道,山茶、芍药、梅花等花粉可超低温保存至少 1 年<sup>[49]</sup>,葡萄花粉可超低温保存至少 5 年<sup>[50]</sup>,美国山核桃的花粉曾被报道可超低温保存长达 10 年<sup>[51]</sup>。本研究报道的桃花粉超低温保存可至少保存 4 年。

随着对超低温保存的日益重视,国内外对部分种质花粉已实现规模化超低温保存,如北京林业大学超低温保存了山茶、芍药、梅等 19 科 71 个物种/品种花粉<sup>[49]</sup>。为了增加种质资源保存的有效性、保存载体的多样性,中国农业科学院作物科学研究所国家作物种质库承担全国农作物种质资源 41 万余份正常型种子的长期保存工作,同时大力构建了以花粉、茎尖、休眠芽等保存载体的无性繁殖作物种质超低温保存技术体系,以提高我国国家作物种质库保存种质的质量和数量<sup>[52]</sup>。本研究对桃种质花粉进行超低温保存和低温保存比较试验,为我国新国家种质库实现规模化花粉超低温保存提供了重要的技术支撑。

### 参考文献

- [1] Li X W, Meng X Q, Jia H J, et al. Peach genetic resources: diversity, population structure and linkage disequilibrium [J]. BMC Genet, 2013, 14: 84
- [2] Micheletti D, Dettori M T, Micali S, et al. Whole-genome analysis of diversity and SNP-major gene association in peach germplasm [J]. PLoS ONE, 2015, 10(9): e0136803
- [3] Preece J E, Aradhya M. The *Prunus* collection at the national clonal germplasm repository in Davis, California [J]. Acta Horticult, 2013, 985: 47-54
- [4] 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
- [5] Benson E E. Cryopreservation theory [M] // Reed B M. Plant cryopreservation: a practical guide. New York: Springer, 2008: 15-30
- [6] Reed B M. Plant Cryopreservation: A Practical Guide [M]. New York: Springer, 2008

- [7] Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity[J]. *In vitro Cell Dev-Pl*, 2011, 47(1): 5-16
- [8] Hanna W W, Towill L E. Long-term pollen storage[M]// Janick J. *Plant breeding reviews*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Inc., 1995: 179-201
- [9] 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
- [10] Cardoso J C, Abdelgalel A M, Chiancone B, et al. Gametic and somatic embryogenesis through *in vitro* anther culture of different *Citrus* genotypes[J]. *Plant Biosyst*, 2016, 150(2): 304-312
- [11] 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
- [12] 王改萍, 彭方仁, 徐涛, 等. 几种不同楸树花粉萌发率的测定及花粉超低温保存方法[J]. *南京林业大学学报*, 2008, 32(5): 123-126
- [13] Chaudhury R, Malik S K, Rajan S. An improved pollen collection and cryopreservation method for highly recalcitrant tropical fruit species of Mango (*Mangifera indica* L.) and Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) [J]. *Cryo Letters*, 2010, 31(3): 268-278
- [14] Alba V, Bisignano V, Alba E, et al. Effects of cryopreservation on germinability of olive (*Olea europaea* L.) pollen[J]. *Genet Resour Crop Ev*, 2011, 58(7): 977-982
- [15] 时婷婷, 张桂玲, 温四民, 等. 百合花粉超低温保存方法研究[J]. *北方园艺*, 2013(3): 64-66
- [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] 李稚, 陈洁, 张洪伟, 等. 桂花花粉超低温保存和花粉管萌发研究[J]. *甘肃农业大学学报*, 2014, 49(1): 99-104
- [18] Karun A, Sajini K K, Nirali V, et al. Coconut (*Cocos nucifera* L.) pollen cryopreservation[J]. *Cryo Letters*, 2014, 35(5): 407-417
- [19] Popova E, Kim H H, Saxena P K, et al. Frozen beauty: The cryobiotechnology of orchid diversity[J]. *Biotechnol Adv*, 2016, 34(4): 380-403
- [20] 常维霞, 姚小华, 龙伟. 山茶属 3 种植物花药超低温保存研究[J]. *中国油料作物学报*, 2016, 38(1): 52-57
- [21] 姜忠国, 董丹, 张琪, 等. 玉蝉花粉生活力检测和超低温保存研究[J]. *安徽农业科学*, 2016, 44(1): 216-219
- [22] 孙果忠. 超低温保存花粉技术在温室玉米加代育种上的应用[J]. *河北农业科学*, 2013(1): 65-67
- [23] Parfitt D E, Almehdi A A. Liquid nitrogen storage of pollen from five cultivated *Prunus* species[J]. *Hortscience*, 1984, 19: 69-70
- [24] Omura M, Akihama T A. Pollen preservation of fruit trees for genebanks in Japan[J]. *Plant Genet Res New Letter*, 1980, 43: 28-31
- [25] 宋尚伟, 闫峰, 蔡艳婷, 等. 桃品种“八月香”花粉的超低温保存[J]. *植物生理学通讯*, 2007, 43(1): 181-183
- [26] 梁峰, 郭莎, 王琳, 等. 扁桃品种晚丰 18 号花粉超低温保存技术研究[J]. *种子*, 2014, 33(9): 29-32
- [27] 宋常美, 李庆宏. 艳红桃花粉离体萌发及超低温保存探究[J]. *种子*, 2015, 34(11): 92-99
- [28] Dafni A, Firmage D. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications[J]. *Plant Syst Evol*, 2000, 222(1): 113-132
- [29] 赵艳华, 吴雅琴, 程和禾, 等. 李离体茎尖的超低温保存[J]. *园艺学报*, 2008, 35(3): 423-426
- [30] 刘丽芳, 陈晓玲, 卢新雄, 等. 甘薯种质超低温保存研究进展[J]. *植物遗传资源学报*, 2009, 10(2): 324-327
- [31] 李俊慧, 何平, 陈晓玲, 等. 香蕉离体茎尖超低温保存研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2010, 11(1): 34-39
- [32] Chen X L, Li J H, Xin X, et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification[J]. *S Afr J Bot*, 2011, 77: 397-403
- [33] Zhang J M, Zhang X N, Lu X X, et al. Optimization of droplet-vitrification protocol for carnation genotypes and ultrastructural studies on shoot tips during cryopreservation[J]. *Acta Physiol Plant*, 2014, 36(12): 3189-3198
- [34] Zhang J M, Huang B, Lu X X, et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of Chinese medicinal plant *Atractylodes macrocephala* Koidz. using a droplet-vitrification method[J]. *Cryo Letters*, 2015, 36(3): 195-204
- [35] Zhang J M, Huang B, Zhang X N, et al. Identification of a highly successful cryopreservation method (droplet-vitrification) for petunia[J]. *In vitro Cell Dev-Pl*, 2015, 51: 445-451
- [36] 韩丽, 张金梅, 卢新雄, 等. 菊芋耐性胁迫及种质保存研究进展[J]. *植物遗传资源学报*, 2014, 15(5): 999-1005
- [37] 张海晶, 张金梅, 辛霞, 等. 马铃薯茎尖超低温保存流程 TTC 活力响应[J]. *植物遗传资源学报*, 2015, 16(3): 555-560
- [38] Kundu M, Dubey A, Srivastav M, et al. Effect of gamma ray irradiation and cryopreservation on pollen stainability, *in vitro* germination, and fruit set in Citrus[J]. *Turk J Biol*, 2014, 38(1): 1-9
- [39] Parton E, Vervaeke I, Delen R, et al. Viability and storage of bromeliad pollen[J]. *Euphytica*, 2002, 125(2): 155-161
- [40] 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
- [41] 张保才, 李晓丹, 崔鸿文. 不同贮藏方式对辣椒花粉生活力及授粉效果的影响[J]. *西北农业学报*, 2013, 22(7): 132-137
- [42] 徐瑾. 玉兰花粉超低温保存机制研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2014
- [43] 李广清. 山茶花粉超低温保存研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2005
- [44] 王琳, 梁峰, 郭莎, 等. 不同保存方式对扁桃花粉保存效果的影响[J]. *中国果树*, 2014(5): 33-36
- [45] Wang L M, Wu J F, Chen J, et al. A simple pollen collection, dehydration, and long-term storage method for litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) [J]. *Sci Horti-Amsterdam*, 2015, 188: 78-83
- [46] Borghezian M, Clauman A D, Steinmacher D A, et al. *In vitro* viability and preservation of pollen grain of kiwi (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev.) A. Chev.) [J]. *Crop Breed Appl Biot*, 2011, 11(4): 338-344
- [47] Mortazavi S M H, Arzani K, Moini A. Optimizing storage and *in vitro* germination of Date Palm (*Phoenix dactylifera*) pollen[J]. *J Agr Sci Tech-Iran*, 2010, 12(2): 181-189
- [48] Vendrame W A, Carvalho V S, Dias J, et al. Pollination of Dendrobium hybrids using cryopreserved pollen[J]. *Hortscience*, 2008, 43(1): 264-267
- [49] Xu J, Li B, Liu Q, et al. Wide-scale pollen banking of ornamental plants through cryopreservation[J]. *Cryo Letter*, 2014, 35(4): 312-319
- [50] Ganeshan S, Alexiander M P. Fertilizing ability of cryopreserved grape (*Vitis vinifera* L.) pollen[J]. *Vitis*, 1990, 29: 145-150
- [51] Sparks D, Yates I E. Pecan pollen stored over a decade retains viability[J]. *Hortscience*, 2002, 37(1): 176-177
- [52] Zhang J M, Xin X, Yin G K, et al. *In vitro* conservation and cryopreservation in National Crop Genebank of China[J]. *Acta Horticult*, 2014, 1039: 309-317