

# 花粉超低温保存研究进展

张亚利 尚晓倩 刘 燕

(北京林业大学园林学院, 国家花卉工程技术研究中心)

**摘要:**为满足种质资源保存和交换以及杂交育种工作的需求,花粉超低温保存研究日渐兴起并逐步深入,保存材料从农作物、果树逐渐扩展到药用植物、园林植物等各类植物花粉。花粉超低温保存研究最初主要集中在保存技术方面,随着研究工作的深入和完善,花粉超低温保存机理的研究也逐渐展开,超低温保存花粉效果的评价,也从花粉染色法、离体萌发法,逐渐发展到田间杂交育种的实际应用。该文对 20 世纪 80 年代以来成功进行了花粉超低温保存研究的植物材料进行了总结,重点介绍了花粉超低温保存技术程序,同时对保存效果的评价及超低温保存机理的研究进展进行了综述。

**关键词:**花粉, 超低温保存, 种质资源

**中图分类号:**Q944.42 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-1522(2006)04-0139-09

ZHANG Ya-li; SHANG Xiao-qian; LIU Yan. *Advances in research of pollen cryopreservation. Journal of Beijing Forestry University* (2006)28(4)139-147 [Ch, 83 ref.] College of Landscape Architecture, National Floriculture Engineering Research Center, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China.

In order to provide conservation and exchange of germplasm resources, and satisfy the requirement of hybridization, pollen cryopreservation has been well developed. Crops, fruits, medicinal and ornamental plants and other material have been involved. Many studies concentrated on the techniques of pollen cryopreservation. With the development of the technique, mechanisms of pollen cryopreservation were initiated. Effects of post-LN pollen were tested not only by staining and germination methods, but also through hybridization. This paper reviewed the plants that had been cryopreserved successfully during the last twenty years, mainly introduced the techniques of pollen cryopreservation and evaluation methods of thawed pollen. Meanwhile, the mechanism research process of pollen cryopreservation was reviewed.

**Key words** pollen, cryopreservation, germplasm

花粉是植物种质的形式之一,它包含该物种的所有基因类型,具有丰富的遗传多样性,是种质保存和交换以及杂交育种的重要材料。但是在自然条件下,许多花粉的寿命非常短,这给种质研究和杂交育种工作带来极大的不便,同时也不利于相关的植物遗传研究。进行花粉的超低温保存研究对于加速育种进程以及完善种质资源保存方法等研究工作都具有重要意义。

超低温技术是进行种质资源保存的一条新途径,它可实现植物种质的长期保存。将超低温保存技术应用于花粉保存,不仅可以大大延长花粉的保存时间,还可以避免病虫害的引入,为地区间、国际

间的种质交换提供方便<sup>[1]</sup>。同时还能服务于育种工作,提高育种效率。与种质保存其他方法相比,该技术具有以下特点和优点:①操作简单易行、占用空间小、安全稳定;②保存成本低,节省人力、物力、财力;③便于国际间的资源交流与合作;④克服传统杂交育种时间和空间的限制,同时为花粉单倍体的培养及加倍获得纯合体植株提供材料。

1922 年 Knowlton 首先报道了一 180℃ 贮存后的金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 花粉仍具有生活力,同时发现降低花粉含水量能够提高冰冻保存的生存率<sup>[2]</sup>。20 世纪 80 年代以来,花粉超低温保存日渐兴起。1979 年 Akihama 等在日本果树实验站建立了花

收稿日期:2005-05-16

http://journal.bjfu.edu.cn

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

第一作者:张亚利,博士生。主要研究方向:园林植物花粉的超低温保存。电话:010-87034919 Email: hebizyl@sohu.com 地址:100083 北京林业大学园林学院。

责任作者:刘燕,教授,博士生导师。主要研究方向:园林植物种质资源保存。电话:010-82376017-601 Email: chbly@sohu.com 地址:同上。

粉库,美国在 20 世纪 80 年代也相继建立了 3 个花粉超低温中心,进行花粉超低温保存并对保存机理进行了探讨<sup>[3]</sup>.中国、印度、英国等国家的花粉超低温保存研究工作也逐渐增多.花粉超低温保存材料从最初的果树、农作物逐渐发展到园林植物、药用植物等植物材料.目前,花粉超低温保存多以研究保存技术为主,对超低温保存前后花粉的生理生化变化和遗传性状的稳定性等机理研究也在逐步展开.

本文对 20 世纪 80 年代以来进行花粉超低温保存研究的植物材料进行了总结,重点介绍了花粉超低温保存技术程序,同时对花粉保存效果的检验及超低温保存机理研究进展进行了综述.

# 1 实现超低温保存的植物花粉

在花粉的超低温保存研究中,日本的花粉库中, -196℃ 保存了 60 个桃栽培品种或品系的花粉<sup>[4]</sup>, -20℃ 保存了 42 个梅及 15 个杏品种的花粉<sup>[5]</sup>.1998 年王君晖等<sup>[6]</sup>初步统计已对雪松(*Cedrus deodara*)、扁柏(*Chamaecyparis obtuse*)、落叶松(*Larix gmelini*)等 10 多种木本植物进行了超低温保存研究.陈霜莹等<sup>[7]</sup>对苹果(*Malus pumila*)、梨、桃、李和樱桃(*Prunus pseudocerasus*)等树种的 39 个品种进行了超低温保存研究.20 世纪 80 年代以来,国内外已见报道的实现花粉超低温保存的植物见表 1.

表 1 实现花粉超低温保存的植物  
TABLE 1 Plants with cryopreserved pollen

植物名称	主要用途	第一作者及文献来源	植物名称	主要用途	第一作者及文献来源
鳄梨( <i>Persa americana</i> )	果树	Sedgley <sup>[8]</sup>	紫菜苔( <i>Brassica campestris</i> var. <i>purpurea</i> )	蔬菜	梁立 <sup>[37]</sup> 、Xu <sup>[38]</sup>
刺葵( <i>Phoenix dactylifera</i> )	果树	Tissert <sup>[9]</sup>	番茄( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	蔬菜	赵树仁 <sup>[2]</sup> 、Sacks <sup>[39]</sup>
欧洲甜樱桃( <i>Prunus avium</i> )	果树	Pafitt <sup>[10]</sup>	水仙属( <i>Narcissus</i> )	园林植物	Bowes <sup>[40]</sup>
巴旦杏( <i>P. amygdalus</i> )	果树	Pafitt <sup>[10]</sup>	耀花豆( <i>Clianthus formosus</i> )	园林植物	Hughes <sup>[41]</sup>
桃( <i>P. persica</i> )	果树	Omura <sup>[4]</sup> 、Pafitt <sup>[10]</sup> 、 江雨生 <sup>[11]</sup>	山茶萸( <i>Cornus florida</i> )	园林植物	Craddock <sup>[42]</sup>
杏( <i>P. amniaca</i> )	果树	Pafitt <sup>[10]</sup>	飞燕草属( <i>Delphinium</i> )	园林植物	Honda <sup>[43]</sup>
李( <i>P. salicina</i> )	果树	Pafitt <sup>[10]</sup>	凤梨科(Bromeliaceae)	园林植物	Parton <sup>[44]</sup>
番木瓜属( <i>Carica</i> )	果树	Ganeshan <sup>[12]</sup>	牡丹( <i>Paeonia</i> spp.)	园林植物	陶清波 <sup>[45]</sup>
核桃( <i>Juglans regia</i> )	果树	Luzar <sup>[13]</sup>	二乔玉兰( <i>Magnolia</i> × <i>soulangeana</i> )	园林植物	Zhang <sup>[46]</sup>
阿月浑子( <i>Pistocia vera</i> )	果树	Polito <sup>[14]</sup>	梅花( <i>Prunus mume</i> )	园林植物	刘燕 <sup>[47-48]</sup>
梨( <i>Prunus pyrifolia</i> )	果树	江雨生 <sup>[11]</sup>	芍药( <i>Paeonia</i> spp.)	园林植物	尚晓倩 <sup>[49]</sup>
葡萄( <i>Vitis vinifera</i> )	果树	Ganeshan <sup>[12]</sup>	山茶( <i>Camellia</i> spp.)	园林植物	李广清 <sup>[50]</sup>
‘广杏’( <i>Prunus amniaca</i> ‘Guangxing’)	果树	王彩虹 <sup>[15]</sup>	小报春( <i>Primula forbesii</i> )	园林植物	金晓霞 <sup>[51]</sup>
‘大接杏’( <i>P. amniaca</i> ‘Dajiesing’)	果树	王彩虹 <sup>[15]</sup>	唐菖蒲( <i>Gladiolus hybrida</i> )	切花	Koopowitz <sup>[52]</sup>
山龙眼属( <i>Protea</i> )	果树	Walt <sup>[16]</sup>	月季( <i>Rosa</i> spp.)	切花	Marchant <sup>[53]</sup> 、 Rajasekharan <sup>[54]</sup>
甜杏( <i>Prunus dulcis</i> )	果树	Martinez <sup>[17]</sup>	希蒙得木( <i>Simmondsia chinensis</i> )	经济作物	Lee <sup>[55]</sup>
美国山核桃( <i>Carya illinoensis</i> )	果树	Sparks <sup>[18]</sup>	啤酒花( <i>Humululus lupulus</i> )	经济作物	Haunold <sup>[56]</sup>
枇杷( <i>Rriobotrya japonica</i> )	果树	王家福 <sup>[19-21]</sup>	茶树‘龙井 43’( <i>Camellia sinensis</i> cv. <i>Longjing</i> ) <sup>[43]</sup>	经济作物	杨素娟 <sup>[57]</sup>
榆叶梅( <i>Prunus triloba</i> )	果树/园林植物	樊新民 <sup>[22]</sup>	诸葛菜( <i>Orychophragmus violaceus</i> )	经济作物	赵云 <sup>[58]</sup>
海棠( <i>Malus spectabilis</i> )	果树/园林植物	樊新民 <sup>[22]</sup>	魔芋( <i>Amorphophallus konjac</i> cv. <i>Wanyuan</i> )	经济作物	张玉进 <sup>[59]</sup>
柿品种‘禅寺丸’( <i>Diospyros kaki</i> cv. <i>Zenjamaru</i> )	果树	艾鹏飞 <sup>[23]</sup>	甘蔗( <i>S. spontaneum</i> )	经济作物	蔡青 <sup>[60]</sup>
菠萝( <i>Ananas comosus</i> )	果树	吕玲玲 <sup>[24]</sup>	商陆( <i>Phytoacca dodecandra</i> )	药用植物	Demeke <sup>[61]</sup>
玉米( <i>Zea mays</i> )	农作物	石思信 <sup>[25]</sup>	浙贝母( <i>Fritillaria thunbergii</i> )	药用植物	苏新 <sup>[62]</sup>
水稻( <i>Oryza sativa</i> )	农作物	李训贞 <sup>[26]</sup> 、胡晋 <sup>[27]</sup>	人参( <i>Panax ginseng</i> )	药用植物	Zhang <sup>[63]</sup>
黑麦( <i>Secale cereale</i> )	农作物	石思信 <sup>[26]</sup>	西洋参( <i>Panax quinquefolium</i> )	药用植物	Zhang <sup>[63]</sup>
山药( <i>Dioscorea</i> spp.)	农作物	Daniel <sup>[29]</sup>	枸桔( <i>Poncirus trifoliata</i> )	药用植物	Rajasekharan <sup>[64]</sup>
马铃薯( <i>Solanum tuberosum</i> )	农作物	王玉萍 <sup>[30]</sup>	象草( <i>Pennisetum purpureum</i> )	牧草	白淑娟 <sup>[65]</sup>
茄属( <i>Solanum</i> )	蔬菜	Towill <sup>[31]</sup>	无芒雀麦( <i>Bromus inermis</i> )	牧草	吴素琴 <sup>[66]</sup>
洋葱( <i>Allium cepa</i> )	蔬菜	Ganeshan <sup>[32]</sup>	偃麦草( <i>Elytrigia repens</i> )	牧草	吴素琴 <sup>[66]</sup>
芹菜( <i>Apium graveolen</i> )	蔬菜	D’Antonio <sup>[33]</sup>	塔落岩黄芪( <i>Hedysarum fruticosum</i> var. <i>leace</i> )	牧草	吴素琴 <sup>[66]</sup>
花椰菜( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> )	蔬菜	Crisp <sup>[34]</sup>	杜仲( <i>Eucomnia ulmoides</i> )	经济林木	陈品良 <sup>[67]</sup>
籽瓜( <i>Citrullus lanatus</i> )	蔬菜	陆培基 <sup>[35]</sup>	秤锤树( <i>Sinojackia xylocarpa</i> )	经济林木	陈品良 <sup>[67]</sup>
甘蓝型油菜( <i>Brassica napus</i> )	蔬菜	Chen <sup>[36]</sup>	鹅掌楸( <i>Liriodendron chinense</i> )	经济林木	尹增芳 <sup>[68]</sup>

注:主要用途分类参照原文献进行.

由表1可见,超低温保存的花粉涵盖了农作物、果树、蔬菜、药材、牧草、经济作物以及园林植物等材料,其中以经济类作物等与人类生活密切相关的植物相对较多.为了满足园林植物杂交育种及资源保存等工作的需要,近几年刘燕等人实现了在园林中广泛应用的植物材料牡丹<sup>[45]</sup>、二乔玉兰<sup>[46]</sup>、梅花<sup>[47-48]</sup>、芍药<sup>[49]</sup>和山茶<sup>[50]</sup>花粉的超低温保存,从而极大的丰富了超低温保存园林植物花粉.从研究的国家来看,美国、日本起步较早,近几年来中国在花粉超低温保存方面的研究不断发展和深入.

关于花粉超低温保存时间的报道中,日本果树实验保存10年的桃花粉<sup>[41]</sup>及Sparks<sup>[18]</sup>保存了10年以上的美国山核桃花粉仍具有生活力,Ganeshan等<sup>[3]</sup>保存了5年的葡萄品种花粉生活力基本保持不变,但结实能力存在变化.希蒙得木<sup>[55]</sup>、玉米<sup>[25]</sup>、阿月浑子<sup>[14]</sup>、牡丹<sup>[45]</sup>、梅花<sup>[48]</sup>等植物花粉在保存1~2年后仍具有生活力.目前,有关花粉在液氮中保存的最长年限、花粉生活力是否随着保存时间的增加而发生变化等问题还有待继续的追踪检测.

## 2 花粉超低温保存技术研究

目前,花粉超低温保存程序一般可概括为:花粉采集—干燥—密封包装—投入液氮容器保存—解冻复苏—用于科研生产<sup>[69]</sup>.另外,在医学及组培物等植物材料的超低温保存中应用的冰冻保护剂、预冷冻及程序性降温在花粉的超低温保存中也有所应用.

### 2.1 花粉的采集

植物花粉的产量、质量、散粉特点往往受到遗传特性及环境等因素的限制.D'Antonio等<sup>[33]</sup>认为一天中不同的时间采集芹菜花粉不影响其生活力.Marchant等<sup>[53]</sup>对未开、半开、全开3种状态月季品种的研究认为,全开或未开的花朵是可取的,尤其是未开的花朵可以减少花粉交叉污染的风险.梁立等<sup>[37]</sup>在紫菜苔花粉超低温保存研究中,对比了幼嫩花粉(开花前7~8 d,单核后期至二核早期)、近成熟花粉(开花前2 d,三核期)和成熟花粉(开花当天)3个发育时期,结果认为成熟花粉的保存效果与近成熟花粉相近,幼嫩花粉较差.Craddock等<sup>[42]</sup>对山茱萸的研究认为刚刚开裂的花药作为保存花粉较好.陶清波<sup>[45]</sup>切取牡丹花枝室内隔离瓶插水养获取花粉与新鲜花粉没有差异.花粉的收集可选用合适的网筛<sup>[11,14,23]</sup>、薄棉布<sup>[64]</sup>等进行.另外,Kopp等<sup>[70]</sup>采用有机溶剂实现了柳树(*Salix*)花粉的收集.从目前的研究来看,大部分植物材料在初花至盛花期采集铃铛花收集到的花粉质量最好.

### 2.2 干燥

超低温保存导致花粉死亡的主要原因是:在冷冻过程中,细胞内的水分形成冰晶,导致细胞膜受损,花粉死亡.新采集的花粉,往往含水量较高,花粉潮湿结块,在液氮保存时,花粉容易结成冰晶,生活力丧失,不宜进行贮藏.因此,目前的许多研究认为适宜的花粉含水量是实现超低温保存的关键.不同植物进行花粉超低温保存的适宜含水量不同.如核桃为7.5%以下<sup>[13]</sup>,‘广杏’最适含水量为13.2%~20.8%,‘大接杏’为9.7%~14.6%<sup>[15]</sup>.对于某些材料如番茄<sup>[39]</sup>、魔芋<sup>[59]</sup>不经过干燥脱水即可直接投入液氮保存.梅花花粉的超低温保存研究结果表明,部分梅花品种花粉含水量高达40%时仍可实现超低温保存<sup>[48]</sup>.从目前的研究结果来看,花粉的含水量是实现花粉超低温保存的重要影响因子,同时植物种类、品种的差异也是影响花粉超低温保存成功与否不容忽视的重要因素.

花粉的干燥脱水主要采用的方法有冷冻真空干燥、真空干燥、干燥剂干燥法<sup>[69]</sup>.另外,石思信等<sup>[25]</sup>采用“风干脱水法”,江雨生等<sup>[11]</sup>采用“灯光烘干法”均获得较好的效果.Rajasekharan等<sup>[54]</sup>认为花药的自然干燥有助于保持最佳的花粉生活力.D'Antonio等<sup>[33]</sup>对芹菜花粉采用31、33、38℃3种温度进行干燥处理发现高温对花粉的生活力是有害的.

### 2.3 包装和保存

超低温保存花粉主要用铝箔纸或冻存管包装,然后进行液氮保存.大多数植物的花粉可以在包装后不经过预处理直接投入液氮,但冰冻保护剂、预冷冻技术及程序性降温对花粉超低温的作用也有所探讨.

#### 2.3.1 冰冻保护剂的使用

在花粉的超低温保存中,大部分植物材料无需使用冰冻保护剂,可以直接进行保存.张玉进等<sup>[59]</sup>在魔芋花粉保存中观察到花粉经30%甘油+15%乙二醇+15%DMSO+0.5 mol/L蔗糖的PVS<sub>2</sub>溶液处理0~40 min,离体萌发率基本不变.梁立等<sup>[37]</sup>采用冰冻保护剂(B<sub>5</sub>培养基,10%DMSO和蔗糖)进行紫菜苔花粉超低温保存研究,认为蔗糖浓度对保存效果有明显影响.Tisserat等<sup>[9]</sup>用不同浓度的PGD(聚乙二醇+葡萄糖+DMSO)处理刺葵花粉5~10 min,发现不同浓度的PGD并没有提高萌发力.Liza等<sup>[13]</sup>对核桃超低温保存的研究中发现甘油处理过的花粉在冻存前后均未萌发.由此可见,在医学及组培物等植物材料的超低温保存中广泛应用的冰冻保护剂对于花粉的超低温保存效果存在差异,通常情况下不使用冰冻保护剂即可实现花粉的超低温保存.

### 2.3.2 预冷冻技术及程序性降温的使用

预冷冻在超低温保存植物茎尖和组培物中应用较多,预冻的目的是为了使细胞内的水分脱出,形成对细胞结构损伤不大的细胞外结冰,这样就可以避免细胞内结冰对原生质的损害.在花粉超低温保存中,预冷冻的效果因植物种类和花粉含水量的不同而有较大差异.江雨生等<sup>[11]</sup>对桃、梨花粉,Zhang等<sup>[63]</sup>对人参花粉以及陶清波等<sup>[45]</sup>对牡丹花粉的研究都表明,预冷冻对花粉超低温保存的效果没有显著影响.Tisserat等<sup>[9]</sup>还发现刺葵花粉经预冷冻处理后比直接投入液氮的花粉生活力有所降低.但赵树仁等<sup>[2]</sup>在对番茄花粉的超低温保存研究中发现,−25℃预冷冻能够显著提高超低温保存后花粉的萌发率.因此对花粉预冷冻的处理不可一概而论.在含水量较低时,直接投入液氮比经过预冻的保存效果要好.这可能是在直接投入液氮的过程中,花粉细胞内的水来不及成冰,而迅速冷却达到玻璃化状态,从而提高了保存的成活率.而对于含水量较高的花粉,预冷冻有利于细胞内的水流到细胞外结冰,发生保护性脱水,提高了花粉冻存的成活率.另外,Chen等<sup>[36]</sup>报道冷处理明显提高了甘蓝型油菜的自然加倍染色体频率,这为单倍体育种提供了一种潜在而有力的方法,同时也从另一个侧面对预冷冻在超低温保存花粉过程中的可行性提出了疑问.

在花粉的超低温保存中,一般情况下不需要经过程序性降温就可以实现超低温保存,因此程序性降温在花粉超低温保存中的应用较少.梁立等<sup>[37]</sup>在紫菜苔花粉超低温保存中,试验了两种降温程序:两步法由0℃以−1℃/min的速度降至−40℃,停留6 min,投入液氮;三步法由0℃以−1℃/min的速度降至−10℃,停留15 min,以相同的速度降至−40℃,停留60 min,直接投入液氮,结果表明,两者均取得良好效果.Bowes<sup>[40]</sup>将水仙属花粉在−130℃预冷1 h, Marchant等<sup>[53]</sup>利用程序降温仪将月季花粉在−40℃预冷冻10 min后再投入液氮也实现了超低温保存.程序性降温的机理在于保证保存材料的细胞达到充分的保护性脱水,避免因细胞内结冰造成的不可逆性伤害.

### 2.4 化冻

花粉的化冻方式一般有自然化冻、温水浴快速化冻、自来水冲洗化冻等几种.许多研究认为,液氮保存对植物发生伤害是在冰冻和化冻两个过程中,因此要使植物种质的超低温保存获得成功,选择合适的化冻方法是非常重要的,从而避免在化冻过程中产生细胞内的次生结冰,并防止在化冻吸水过程中水的渗透冲击对细胞膜体系的破坏.

超低温保存材料在化冻时,再次结冰的危险温度区大约是一5~10℃<sup>[71]</sup>,因此化冻一般在30~40℃温水浴中进行,借助迅速的化冻速度通过此温度区,避免细胞内次生结冰对细胞的致死性破坏.王彩虹等<sup>[15]</sup>采用0、16和37℃3种温度进行化冻,研究认为含水量为7.3%的‘广杏’和含水量为7.2%的‘大接杏’采用任何一种化冻温度都获得良好效果,花粉含水量较高时采用37℃温水浴化冻效果较好.陈品良等<sup>[67]</sup>报道杜仲花粉含水量为30%时40℃下解冻较好.赵树任等<sup>[2]</sup>对番茄花粉采用室温(23℃)、37℃水浴、0℃和自来水冲洗30 min 4种方法,结果表明自来水冲洗较理想.Towill<sup>[31]</sup>在50℃水浴中化冻10 s实现了茄属花粉超低温保存.陶清波<sup>[45]</sup>对牡丹花粉超低温保存的化冻方法进行研究,认为30℃温水浴化冻花粉有较高的萌发率.我们对梅花花粉的研究结果认为,室温、自来水冲洗及温水浴3种化冻方法中,室温化冻效果一般较差,另外两种化冻方法的效果差异不明显<sup>[47]</sup>.综上所述,何种化冻方法的选择应根据不同的植物花粉及其含水量决定.

### 2.5 花粉的反复冻存

为检测花粉从液氮中反复取用对保存效果的影响,人们进行了花粉反复冻存的研究.Koopowitz等<sup>[52]</sup>对唐菖蒲花粉的研究认为,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.Sedgley<sup>[8]</sup>对鳄梨花粉的超低温保存研究表明,二次冻存对生活力造成损伤.Hughes等<sup>[41]</sup>认为反复冻存3次对耀花豆花粉的生活力影响不大.Sacks等<sup>[39]</sup>认为番茄花粉的二次冻存不影响其生活力.Ganeshan<sup>[12]</sup>认为番木瓜花粉对反复冻存的忍受能力较高,由此可见,花粉忍受反复冻存的能力与植物特性及其含水量存在相关性.

## 3 花粉超低温保存效果的检验

目前,花粉超低温保存效果的检验主要采用花粉生活力评价.主要方法有染色法、离体萌发法及授粉法等进行检验<sup>[72-74]</sup>.染色法主要包括荧光染料反应法、品红、醋酸洋红、碘-碘化钾染色法等.离体萌发法包括悬滴法和琼脂盘法,是目前应用最为广泛的快速测定花粉生活力的方法.活体萌发法是根据花粉在柱头上的萌发率来判断其生活力,Sedgley<sup>[8]</sup>、Parton等<sup>[44]</sup>曾用此法进行鳄梨、凤梨花粉的生活力检验.人工授粉法是鉴定花粉保存效果比较可靠和精确的方法,在花粉超低温保存中的应用日渐增多.

### 3.1 超低温保存花粉萌发率的检验

采用离体萌发法检验花粉生活力的结果表明,

大部分植物花粉保存前后萌发率基本保持不变,部分种类出现降低或升高的现象.对茄属<sup>[31]</sup>、月季<sup>[54]</sup>的研究发现部分品种超低温保存后花粉萌发率有明显的降低.Polito等<sup>[44]</sup>对4种雄性阿月浑子无性繁殖系进行研究,其中有一品系在保存4个月后萌发力降低,而保存12个月后萌发力比4个月时增加近两倍.张玉进等<sup>[59]</sup>发现魔芋花粉经超低温保存后比新鲜花粉有更高的离体萌发率.Walt等<sup>[16]</sup>对山龙眼属花粉进行超低温保存发现,某些种在保存270d时萌发率明显升高.我们在对牡丹、梅花及山茶花粉的超低温保存研究中也发现某些品种保存后其萌发率升高.刘燕等<sup>[75]</sup>在进行园林植物种子的超低温保存中发现彩叶草等种子有明显的“冷刺激”现象.其原因目前尚不清楚.

### 3.2 超低温保存花粉结实率的检验

进行花粉超低温保存的主要目的之一是为了满足杂交育种工作的需要,因此,超低温保存花粉是否能在授粉后正常结实是人们普遍关注的问题.

运用人工授粉法进行冻存前后花粉生活力的比较,研究结果普遍认为,用液氮保存后的花粉进行授粉,植物的结实率与新鲜花粉授粉结实率相近.石思信等<sup>[76-77]</sup>的研究认为在适宜的含水量超低温保存1~2年的玉米花粉授粉结实能力与对照差异不显著.Crisp等<sup>[34]</sup>对花椰菜花粉的研究结果表明冻存前后结实率没有差异,但冻存花粉收获的种子生活力降低,萌发率迅速丧失.Rajasekharan等<sup>[64]</sup>对超低温保存枸桔花粉的研究认为超低温对花粉的生活力基本没有影响,但其杂种后代的再生能力较低.从目前的研究结果来看,超低温对花粉的授粉结实能力并没有太多影响,至于超低温保存花粉与新鲜花粉授粉后得到的果实以及后代是否存在差异还有待进一步的观察研究.

## 4 花粉超低温保存机理研究

### 4.1 超低温保存对细胞超微结构的影响

生物膜是植物细胞及细胞器与环境的一个界面结构,各种逆境对细胞的影响首先作用于质膜.在植物遭受低温伤害时,膜上产生龟裂,膜的透性增大,膜结合酶结构发生改变,导致植物细胞生理代谢变化和功能的紊乱<sup>[78]</sup>.超低温保存前后细胞超微结构是否发生变化也是评价超低温保存效果的重要指标.

尹增芳等<sup>[68]</sup>在鹅掌楸花粉超低温保存的研究中发现,在超低温快速冷冻的条件下,保存5d的花粉仍然具有与新鲜花粉相近的萌发率,并且其超微结构也呈正常状态,细胞膜系统保存完好.在保存

15d后花粉的细胞超微结构发生严重损伤,内膜系统及细胞器发生降解,25d后几乎观察不到存活的花粉.鹅掌楸花粉在4℃条件下保存时,花粉的萌发率大大下降,细胞内膜系统发生降解,死亡的花粉细胞质膜释放大量膜脂,在膜上形成大量拟脂颗粒,细胞器降解,细胞质空泡化.说明4℃已经引起鹅掌楸花粉的寒害.Sparks<sup>[18]</sup>对液氮中保存了10年以上的美国山核桃花粉进行了形态学分析,对完整的花粉粒和花粉横切面进行观察发现,存活的花粉细胞质分布均匀,细胞膜结构完整.而死亡的花粉细胞质分布不均匀,由于细胞膜的瓦解,导致细胞质中明显缺少填充物,这是两者之间的一个显著区别.

### 4.2 遗传完整性和稳定性的影响

石思信等<sup>[79]</sup>以超低温保存1~2年的玉米花粉产生的种子作为试验材料,播种于田间,观察植株在田间的农艺性状,并以此作为评估玉米花粉超低温长期保存后是否保持原品种遗传特性的指标之一.研究结果表明,经长期冷冻保存花粉产生的后代植株,具有遗传特征的农艺性状,如株形、叶色、株高等与对照相比没有差异,保持了原自交系的特征.说明玉米花粉在超低温保存条件下,可以使玉米花粉的寿命从几小时延长到几年,并能够保持其品种的遗传稳定性.Crisp等<sup>[34]</sup>在对花椰菜花粉超低温保存农艺性状的研究中发现,花粉冻存前后结实率没有差异,但超低温保存的花粉收获的种子生活力降低,萌发率迅速丧失,其后代的性状没有表现出基因型的改变.Rajasekharan等<sup>[64]</sup>对枸桔花粉超低温保存的研究发现,其杂种后代的再生能力较低,但超低温保存对花粉的生活力和遗传稳定性基本没有影响.

石思信等<sup>[80]</sup>对玉米花粉超低温长期保存后其后代的染色体进行了观察,结果表明,在观察的试验材料中,没有发现染色体数目的变异,没有发现多价体,但终变期有少数“8”状染色体,花粉母细胞减数分裂后期发现有不同程度的染色体桥和断片,但这些不正常染色体的比例与对照相同或相近.总的来说,玉米花粉超低温保存1~2年后,其后代的染色体数目正常,不正常染色体出现频率没有增加.表明经超低温保存的花粉基本上可以保证其遗传稳定性.

石思信等<sup>[77,81-82]</sup>将玉米花粉超低温保存1年后,进行过氧化物同工酶分析,发现其酶谱类型基本没有变化,没有酶带数目的增减,仅有酶带颜色深浅的不同,表示了各处理间酶活性的差异.新鲜花粉酶带颜色较浅,经超低温保存后酶带颜色加深.另外,利用冷冻花粉产生的种子的过氧化物同工酶谱与对照的酶谱相比,也没有变化,保持原酶谱类型.石思

信<sup>[28]</sup>在对黑麦花粉的超低温保存实验中也得到相同的结论,将冻存花粉同新鲜花粉进行过氧化物酶同工酶测定,发现酶谱中没有酶带数目的增减,仅有酶带宽度、色深的区别。

另外,在花粉的超低温保存中,超低温对花粉细胞内含物质是否造成影响也是一个很值得研究的问题。赵树仁等<sup>[2]</sup>将番茄新鲜花粉置于0和-196℃保存10 d后测定其脯氨酸含量,发现在0℃下贮藏的花粉脯氨酸含量明显增多,而液氮中保存的花粉脯氨酸含量与对照相比没有明显变化。超低温保存诸葛菜花粉的脯氨酸含量略有上升<sup>[58]</sup>。在牡丹花粉超低温前后,可溶蛋白、脯氨酸、MDA、SOD、CAT、POD及可溶糖含量均有一定程度的变化,但并不明显<sup>[45,83]</sup>。目前,有关花粉超低温保存前后生理生化研究还比较少,其生理生化变化是与低温研究领域一致,还是有其自身的规律等问题有待于进一步深入研究。

## 5 问题与展望

花粉的超低温保存研究至今仅有几十年的研究历史,研究的对象主要集中在农作物和园艺作物,对观赏植物和园林花卉方面的植物资源研究较少。目前的研究主要在技术程序方面,但是对植物种质资源超低温保存机理的研究很少,而且也不够全面和深入。

1) 与组培物、茎尖等植物材料的超低温保存技术相比,花粉的超低温保存技术相对简单易行,不破坏植株,但保存过程中花粉含水量对于不同植物材料的影响程度等问题还有待于进一步的摸索。

2) 目前的研究主要集中在超低温保存前后花粉活力的变化方面,而对其在液氮中是否处于生机停顿状态,花粉膜透性、内含物质等方面是否有变化等问题还有待研究。

3)  $\text{Ca}^{2+}$  信使系统在植物低温信息传递中起重要作用,同时花粉细胞质中自由  $\text{Ca}^{2+}$  浓度与花粉萌发和花粉管伸长关系密切。花粉超低温保存前后  $\text{Ca}^{2+}$  动态变化信息可能与“冷刺激”现象以及抗冻蛋白的产生等问题有一定的相关性。

随着低温生物学、医学及生物技术等领域的发展,以及花粉超低温保存研究自身的不断深入,各学科相互借鉴和渗透,花粉超低温保存技术及机理研究将会不断完善和深入,从而为杂交育种、种质资源的长期保存等各种研究工作奠定基础。

## 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, 1996, 4(3): 75-82.

YIN X H, SHU L H. Advances in cryopreservation on plant gemplasm[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 1996, 4(3): 75-82.

[2] 赵树任,武丽英,姚民昌,等. 番茄花粉超低温保存研究[J]. 园艺学报, 1993, 20(1): 66-70.

ZHAO S R, WU L Y, YAO M C, *et al.* The cryopreservation of tomato pollen[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 1993, 20(1): 66-70.

[3] GANESHAN S, ALEXANDER M P. Fertilizing ability of cryopreserved grape (*Vitis vinifera* L.) pollen[J]. *Vitis*, 1990, 29: 145-150.

[4] OMURA M, AKIHAMA T A. Pollen preservation of fruit trees for genebanks in Japan[J]. *Plant Genetic Resources News Letter*, 1980, 43: 28-31.

[5] OMURA M, MATSUTA N, AKIHAMA T A, *et al.* Pollen preservation of Japanese apricot and mume [J]. *Plant Genetic Resources News Letter*, 1982, 49: 19-21.

[6] 王君晖,黄纯农. 木本植物种质超低温保存的研究进展[J]. 世界林业研究, 1998(5): 6-11.

WANG J H, HUANG C N. Progress in the research of cryopreservation of woody plant gemplasm [J]. *World Forestry Research*, 1998(5): 6-11.

[7] 陈霜莹,常永健,赵艳华,等. 果树花粉的超低温保存研究[J]. 华北农学报, 1993, 8(增刊): 60-64.

CHEN S Y, CHANG Y J, ZHAO Y H, *et al.* Supercryopreservation of fruit tree pollens [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 1993, 8(Supp.): 60-64.

[8] SEDGLEY M. Storage of avocado pollen[J]. *Euphytica*, 1981, 30: 595-599.

[9] TISSERAT B, ULRICH J M, FINKLE B J. Survival of phoenix pollen grains under cryogenic conditions[J]. *Crop Science*, 1983, 23: 254-256.

[10] PARFITT D E, ALMEHDI A A. Liquid nitrogen storage of pollen from five cultivated *Prunus* species[J]. *HortScience*, 1984, 19(1): 69-70.

[11] 江雨生,高铸九. 桃、梨花粉的超低温(-196℃)贮藏[J]. 上海农业学报, 1989, 5(1): 1-8.

JIANG Y S, GAO Z J. Pollen cryopreservation of *Amygdalus persica* and *Prunus pyrifolia*[J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 1989, 5(1): 1-8.

[12] GANESHAN S. Cryogenic preservation of papaya pollen [J]. *Scientia Horticulturae*, 1986, 28: 65-70.

[13] LUZA J G, POLITO V S. Cryopreservation of English walnut (*Juglans regia* L.) pollen[J]. *Euphytica*, 1988, 37: 141-148.

[14] POLITO V S, LUZA J G. Low temperature storage of pistachio pollen[J]. *Euphytica*, 1988, 39: 265-269.

[15] 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.

WANG C H, LI J R. Study of low and super-low temperature storage in pollens of apricot [J]. *Journal of Laiyang Agricultural College*, 1996, 13(2): 169-173.

[16] VAN DER WALT D, LITTLEJOHN G M. Storage and viability testing of protea pollen[J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1996, 121(5): 804-809.

- [17] MARTINEZ-GOMEZ P, GRADZIEL T M, ORTEGA E. *et al.* Low temperature storage of almond pollen [J]. *HortScience*, 2002, 37(4): 691-692.
- [18] SPARKS D, YATES I E. Pecan pollen stored over a decade retains viability [J]. *HortScience*, 2002, 37(1): 176-177.
- [19] 刘月学. 枇杷种质离体保存的初步研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2002.
- LIU Y X. Preliminary studies on gemplasm preservation *in vitro* of loquat (*Eriobotria japonica* Lindl.) [D]. Fujian: Fujian Agriculture and Forestry University, 2002.
- [20] 刘小军. 枇杷种质离体保存及生理生化研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2003.
- LIU X J. A study of physiology and biochemistry on gemplasm preservation *in vitro* of loquat [D]. Fujian: Fujian Agriculture and Forestry University, 2003.
- [21] 王家福, 刘月学, 刘小军, 等. 枇杷花粉干冻法超低温保存研究[J]. 中国农学通报, 2004, 20(1): 1-2, 20.
- WANG J F, LIU Y X, LIU X J, *et al.* Dry freezing cryopreservation of loquat pollen [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2004, 20(1): 1-2, 20.
- [22] 樊新民, 牛建新, 孙爱新, 等. 榆叶梅和海棠花粉萌发率的测定及超低温保存方法[J]. 湖北农业科技, 2004(6): 65-66, 58.
- FAN X M, NIU J X, SUN A X, *et al.* Studies on pollen germination rate and cryopreservation method on *Prunus triloba* and *Malus spectabilis* [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2004(6): 65-66, 58.
- [23] 艾鹏飞, 罗正荣. 柿品种‘禅寺丸’花粉超低温保存研究[J]. 华中农业大学学报, 2004, 23(5): 563-565.
- AI P F, LUO Z R. Cryopreservation of pollen of ‘Zenjimarū’ persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2004, 23(5): 563-565.
- [24] 吕玲玲. 菠萝花粉保存研究初报(简报)[J]. 上海农业学报, 2005, 21(1): 95-97.
- LÜ L L. Preliminary study on the preservation of pineapple pollen [J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2005, 21(1): 95-97.
- [25] 石思信, 田玥, 曹心如. 利用液氮保存玉米花粉[G]// 马缘生. 作物种质资源保存技术. 北京: 学术书刊出版社, 1989: 86-91.
- SHI S X, TIAN Y, CAO X R. Storage maize pollen in liquid nitrogen [G]// MA Y S. Preservation technology of crop gemplasm resources. Beijing: Learning Books and Periodicals Publishing House, 1989: 86-91.
- [26] 李训贞. 水稻花粉贮藏的研究[J]. 农业科技通讯, 1987(6): 2-4.
- LI X Z. Reserch on storage of ripe pollen [J]. *Bulletin of Agricultural Sciences and Technology*, 1987(6): 2-4.
- [27] 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.
- HU J, GUO C G. Studies on the cryopreservation (-196℃) of pollen of restoring line in hybrid rice [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 1996, 22(1): 72-77.
- [28] 石思信, 曹心如, 肖建平. 黑麦花粉超低温保存及过氧化物酶同工酶变化[J]. 作物品种资源, 1992(3): 33-35.
- SHI S X, CAO X R, XIAO J P. Cryopreservation and peroxidase isoenzyme changes of *Secale cereale* pollen [J]. *Crop Germplasm Resources*, 1992(3): 33-35.
- [29] DANIEL I O, NG N Q, TAYO T O. *et al.* Wet-cold preservation of west African yam (*Dioscorea* spp.) pollen [J]. *Journal of Agricultural Science*, 2002, 138: 57-62.
- [30] 王玉萍, 张峰, 王蒂. 马铃薯花粉的超低温保存研究[J]. 园艺学报, 2003, 30(6): 683-686.
- WANG Y P, ZHANG F, WANG D. The cryopreservation of potato pollen [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003, 30(6): 683-686.
- [31] TOWILL L E. Liquid nitrogen preservation of pollen from tuber-bearing solanum species [J]. *HortScience*, 1981, 16(2): 177-179.
- [32] GANESHAN S. Viability and fertilizing capacity of onion pollen (*Allium cepa* L.) stored in liquid nitrogen (-196℃) [J]. *Trop Agric*, 1986, 63(1): 46-48.
- [33] D'ANTONIO V, QUIROS C F. Viability of celery pollen after collection and storage [J]. *HortScience*, 1987, 22(3): 479-481.
- [34] CRISP P, GROUT B W W. Storage of broccoli pollen in liquid nitrogen [J]. *Euphytica*, 1984, 33: 819-823.
- [35] 陆培基, 苏军, 叶文, 等. 籽瓜花粉的液氮保存研究[J]. 福建省农科院学报, 1992, 7(1): 32-35.
- LU P J, SU J, YE W, *et al.* The pollen cryopreservation of *Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansfeld [J]. *Journal of Fujian Academy of Agricultural Sciences*, 1992, 7(1): 32-35.
- [36] CHEN J L, BEVERSDORF W D. Production of spontaneous diploid lines from isolated microspores following cryopreservation in spring rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. *Plant Breeding*, 1992, 108: 324-327.
- [37] 梁立, 徐秉芳, 郑从义, 等. 紫菜苔花粉超低温保存及其原生质体分离[J]. 植物学报, 1993, 35(10): 733-738.
- LIANG L, XU B F, ZHENG C Y, *et al.* Pollen cryopreservation and pollen protoplast isolation in *Brassica campestris* var. *purpurea* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1993, 35(10): 733-738.
- [38] XU B F, HAN H M, ZHENG C Y, *et al.* Cryopreservation of pollen by vitrification in *Brassica* [J]. *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, 1997, 2(1): 120-123.
- [39] SACKS E J, CLAIR D A S. Cryogenic storage of tomato pollen: effect on fecundity [J]. *HortScience*, 1996, 31(3): 447-448.
- [40] BOWES S A. Long-term storage of narcissus anthers and pollen in liquid nitrogen [J]. *Euphytica*, 1990, 48: 275-278.
- [41] HUGHES H G, LEE C W, TOWILL L E. Low-temperature preservation of *Clianthus formosus* pollen [J]. *HortScience*, 1991, 26(11): 1 411-1 412.
- [42] CRADDOCK J H, REED S M, SCHLARBAUM E S, *et al.* Storage of flowering dogwood (*Cornus florida* L.) pollen [J]. *HortScience*, 2000, 35(1): 108-109.
- [43] HONDA K, WATANABE H, TSUTSUI K. Cryopreservation of *Delphinium* pollen at -30℃ [J]. *Euphytica*, 2002, 126: 315-320.
- [44] PARTON E, VERVAEKE I, DELEN R, *et al.* Viability and storage of bromeliad pollen [J]. *Euphytica*, 2002, 125: 155-161.
- [45] 陶清波. 牡丹花粉超低温保存研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2003.

- TAO Q B. Studies on cryopreservation of tree peony pollen [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2003.
- [46] ZHANG Y L, LIU Y. Pollen viability test and low temperature storage of *Magnolia* × *soulangeana* [C]// World Congress of Cryobiology and Cryomedicine: The 41st Annual Meeting of the Society for Cryobiology. Beijing: CRYO '2004 Organization Committee, 2004: 180.
- [47] ZHANG Y L, LIU Y. Pollen cryopreservation of *Prunus mume* [J]. *Cryobiology*, 2004, 49(3): 328.
- [48] 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.
- LIU Y, ZHANG Y L. Pollen cryopreservation of *Prunus mume* [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2004, 26(Supp.): 22-25.
- [49] 尚晓倩. 芍药花粉超低温保存研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2005.
- SHANG X Q. Studies on cryopreservation of peony pollen [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2005.
- [50] 李广清. 山茶花粉超低温保存研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2005.
- LI G Q. Studies on cryopreservation of *Camellia* pollen [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2005.
- [51] 金晓霞, 张亚利, 张启翔. 小报春花花粉萌发和贮藏方法的研究[C]//中国园艺学会观赏园艺专业委员会. 中国观赏园艺研究进展. 北京: 中国林业出版社, 2005: 212-215.
- JIN X X, ZHANG Y L, ZHANG Q X. Studies on the germination and storage of *Primula forbesii* pollen [C]// Special Institute of Ornamental Horticulture, China Horticulture Institute. Advances in ornamental horticulture of China. Beijing: China Forestry Publishing House, 2005: 212-215.
- [52] KOPOWITZ H, VOSS R, O'NEIL C. Long-term storage of *Gladiolus* pollen [J]. *HortScience*, 1984, 19(4): 513-514.
- [53] MARCHANT R, POWER J B, DAVEY M R, et al. Cryopreservation of pollen from two rose cultivars [J]. *Euphytica*, 1993, 66: 235-241.
- [54] RAJASEKHARAN P E, GANESHAN S. Freeze preservation of rose pollen in liquid nitrogen: Feasibility, viability and fertility status after long-term storage [J]. *Journal of Horticultural Science*, 1994, 69(3): 565-569.
- [55] LEE C W, THOMAS J C, BUCHMANN S L. Factors affecting *in vitro* germination and storage of jojoba pollen [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1985, 110(5): 671-676.
- [56] HAUNOLD A, STANDWOOD P C. Long-term preservation of hop pollen in liquid nitrogen [J]. *Crop Science*, 1985, 25: 194-196.
- [57] 杨素娟, 王玉书, 王立, 等. 茶树花粉的超低温(LN<sub>2</sub>, -196℃)保存[J]. 茶叶科学, 1993, 13(1): 27-30.
- YANG S J, WANG Y S, WANG L, et al. A study on tea pollen cryopreservation (LN<sub>2</sub>, -196℃) [J]. *J Tea Sci*, 1993, 13(1): 27-30.
- [58] 赵云, 王茂林, 王天叫. 诸葛菜花粉的超低温保存研究[J]. 西南农业学报, 1995, 8(3): 65-69.
- ZHAO Y, WANG M L, WANG T J. Low temperature pollen preservation of *Orychophragmu violaceus* [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 1995, 8(3): 65-69.
- [59] 张玉进, 张兴国, 刘佩瑛. 魔芋花粉的低温和超低温保存[J]. 园艺学报, 2000, 27(2): 139-140.
- ZHANG Y J, ZHANG X G, LIU P Y. Conservation of *Amorphophallus* pollen at low temperature and in liquid nitrogen [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2000, 27(2): 139-140.
- [60] 蔡青, 范源洪, 夏红明, 等. 甘蔗细茎野生种(*S. spontaneum*) F<sub>1</sub>代花粉的低温贮藏研究[J]. 甘蔗, 2000, 7(3): 1-7.
- CAI Q, FAN Y H, XIA H M, et al. Pollen storage of F<sub>1</sub> *S. spontaneum* at low temperature [J]. *Sugarcane*, 2000, 7(3): 1-7.
- [61] DEMEKE T, HUGHES H G. Germination and storage of pollen of *Phytolacca dodecandra* L. (endod) [J]. *Annals of Botany*, 1991, 68: 13-15.
- [62] 苏新. 浙贝母花粉超低温保存方法的研究[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(7): 399-400.
- SU X. Methods of cryopreservation of pollen in *Fritillaria thunbergii* Miq [J]. *Journal of China Traditional Medicine*, 1991, 16(7): 399-400.
- [63] ZHANG L X, CHANG W C, LIU Y J, et al. Cryopreservation of ginseng pollen [J]. *HortScience*, 1993, 28(7): 742-743.
- [64] RAJASEKHARAN P E, GANESHAN S, THAMIZHARASU V. Expression of trifoliate leaf character in *Citrus limonia* × *Poncirus trifoliata* hybrids through cryostored pollen [J]. *Journal of Horticultural Science*, 1995, 70(3): 485-490.
- [65] 白淑娟, 顾洪如, 丁成龙, 等. 象草花粉贮藏的研究[J]. 江苏农业科学, 1994(5): 61-63.
- BAI S J, GU H R, DING C L, et al. Storage of *Pennisetum purpureum* pollen [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 1994(5): 61-63.
- [66] 吴素琴, 宁布, 包来晓. 液氮保存牧草花粉生活力的研究[J]. 中国草业, 1996(4): 30-31.
- WU S Q, NING B, BAO L X. Study on reeping viability of herbage pollen in liquid nitrogen [J]. *Grassland of China*, 1996(4): 30-31.
- [67] 陈品良, 贺善安, 金炜, 杜仲, 秤锤树花粉的超低温贮藏研究[J]. 植物学报, 1990, 32(4): 288-291.
- CHEN P L, HE S A, JIN W. Cryopreservation of pollen from *Eucommia ulmoides* Oliv. and *Sinojackia xylocarpa* Hu [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1990, 32(4): 288-291.
- [68] 尹增芳, 樊汝汶, 尤录祥. 鹅掌楸花粉保存条件的比较研究[J]. 江苏林业科技, 1997, 24(2): 5-8.
- YIN Z F, FAN R W, YOU L X. The study on the storage conditions of *Liriodendron chinense* Sarg. pollen [J]. *Journal of Jiangsu Forestry Science & Technology*, 1997, 24(2): 5-8.
- [69] 胡晋. 花粉的保存和生活力测定[J]. 种子, 1992(6): 33-35.
- HU J. Storage and viability test for pollen [J]. *Seed*, 1992(6): 33-35.
- [70] KOPP R F, MAYNARD C A, NIELLA P R D, et al. Collection and storage of pollen from *Salix* [J]. *America Journal of Botany*, 2002, 89(2): 248-252.
- [71] 陈品良. 植物组织培养物的超低温保存[J]. 武汉植物学研究, 1989, 7(4): 390-398.
- CHEN P L. Cryopreservation of plant tissue cultures [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 1989, 7(4): 390-398.
- [72] 刘武林. 花粉的采集、贮藏和生活力检验[J]. 吉林农业科学, 1981(3): 87-94.

- LIU W L. Pollen collection, storage and viability test [J]. *Journal of Jilin Agricultural Sciences*, 1981(3): 87-94.
- [73] 胡适宜. 植物胚胎学实验方法(一):花粉生活力鉴定[J]. *植物学通报*, 1993, 10(2): 60-62.
- HU S Y. Experimental methods in plant embryology ( I ); Determination of pollen viability [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 1993, 10(2): 60-62.
- [74] 王钦丽, 卢龙斗, 吴小琴, 等. 花粉的保存及其生活力测定[J]. *植物学通报*, 2002, 19(3): 365-373.
- WANG Q L, LU L D, WU X Q, et al. Pollen preservation and its viability test [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2002, 19(3): 365-373.
- [75] 刘燕, 周慧, 方标. 园林花卉种子超低温保存研究[J]. *北京林业大学学报*, 2001, 23(4): 39-44.
- LIU Y, ZHOU H, FANG B. Cryopreservation of seed of ornamental plants [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2001, 23(4): 39-44.
- [76] 石思信, 田玥. 玉米花粉超低温保存一年后的结实能力 [G]// 马缘生. 作物种质资源保存技术. 北京: 学术书刊出版社, 1989: 79-85.
- SHI S X, TIAN Y. Fertility of maize (*Zea mays* L.) pollen after one year cryopreservation [G]// MA Y S. Preservation technology of crop germplasm resources. Beijing: Learning Books and Periodicals Publishing House, 1989: 79-85.
- [77] 石思信, 张志娥, 肖建平. 玉米花粉超低温长期保存后遗传稳定性的研究[J]. *作物学报*, 1996, 22(4): 409-413.
- SHI S X, ZHANG Z E, XIAO J P. Genetic stability in maize pollen after long-term cryopreservation [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 1996, 22(4): 409-413.
- [78] 江福英, 李延, 翁伯琦. 植物低温胁迫及其抗性生理[J]. *福建农业学报*, 2002, 17(3): 190-195.
- JIANG F Y, LI Y, WENG B Q. Review on physiology of chilling stress and chilling resistance of plants [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2002, 17(3): 190-195.
- [79] 石思信, 张志娥, 肖建平. 玉米花粉超低温长期保存对其后代农艺性状的影响[J]. *北京农业科学*, 1994, 12(5): 14-15.
- SHI S X, ZHANG Z E, XIAO J P. Effects on maize offspring's agricultural characters by pollen cryopreservation [J]. *Beijing Agricultural Science*, 1994, 12(5): 14-15.
- [80] 石思信, 张志娥, 肖建平. 玉米花粉超低温长期保存后其后代的染色体观察[J]. *作物品种资源*, 1995(2): 45-47.
- SHI S X, ZHANG Z E, XIAO J P. Chromosomal observation of maize offspring after pollen longtime storage by cryopreservation [J]. *Crop Germplasm Resources*, 1995(2): 45-47.
- [81] 张志娥, 石思信, 肖建平. 玉米花粉超低温长期保存后过氧化物酶同工酶的表现[J]. *玉米科学*, 1995, 3(1): 63-65.
- ZHANG Z E, SHI S X, XIAO J P. The changes of peroxidase isoenzyme in maize pollen after longtime storage by cryopreservation [J]. *Journal of Maize Sciences*, 1995, 3(1): 63-65.
- [82] 石思信, 张志娥, 肖建平. 玉米花粉超低温保存后的同工酶和醇溶蛋白图谱分析[J]. *安徽农业科学*, 1997, 25(11): 5-16.
- SHI S X, ZHANG Z E, XIAO J P. The analysis for isozyme and alcohol-soluble protein pattern of maize pollen after cryopreserved [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 1997, 25(11): 5-16.
- [83] 尚晓倩, 陶清波, 刘燕. 牡丹花粉超低温保存前后生理生化变化研究 [C]// 中国园艺学会观赏园艺专业委员会. 中国观赏园艺研究进展. 北京: 中国林业出版社, 2004: 197-199.
- SHANG X Q, TAO Q B, LIU Y. The changes of some physiological properties of tree peony pollen after cryopreservation [C]// Special Institute of Ornamental Horticulture, China Horticulture Institute. Advances in ornamental horticulture of China. Beijing: China Forestry Publishing House, 2004: 197-199.

(责任编辑 董晓燕)