

小麦花粉的低温和超低温保存研究

王 慧 张从合 汪和廷 黄艳玲 严 志 管昌红

(安徽荃银高科种业股份有限公司 / 农业农村部杂交稻新品种创制重点实验室, 合肥 230088)

摘要:研究小麦花粉的保存条件,对小麦杂交育种和种质资源保存具有重要意义。对小麦花粉进行低温冷藏(4℃)、低温冷冻(-20℃)和超低温冷冻(-196℃)保存比较试验,并分析了影响小麦花粉不同保存方式授粉效果的因素。结果表明:4℃不利于小麦花粉的保存,-20℃适宜小麦花粉的短期(7d)保存,-196℃适宜花粉的长期(368d)保存;经过-20℃和-196℃保存后的花粉可进行异地授粉;冷冻花粉适宜的干燥条件是温度20℃、湿度25%、干燥1h,最简便适合的复苏方式是室温(25℃)自然复苏。研究结果为杂交小麦制种提供了重要的技术支撑。

关键词:小麦;花粉;保存条件;复苏方式;杂交

小麦是最重要的粮食作物之一,也是目前尚未大规模开展杂种优势利用的作物之一,杂交小麦是小麦杂种优势利用的具体形式,一般可以使小麦产量提高15%~30%,大面积推广杂交小麦对确保国家粮食安全有着重要的意义^[1-2]。杂交小麦种子生产过程中提高不育系结实粒数是提高制种产量的主要途径之一^[3-4]。多年来,相关单位积极开展了杂交小麦的高产制种技术研究,针对不同的亲本组合开展花期调节、授粉技术、隔离技术、父母本行比、机械化混播制种等^[1,5-8],但仍然存在制种成本较高、受环境影响较大且种子质量不达标风险,不利于杂交小麦的推广和机械化制种。因此,建立以高产、低成本为目标的规模化、机械化、标准化的杂交小麦种子生产技术体系非常迫切。

如果能够将小麦花粉进行集中收集、保存并保持其花粉活力,将会推进杂交小麦的应用进程。据统计,国内外已对包括主要农作物在内的170多种植物开展了花粉超低温保存技术研究,并将超低温保存的花粉成功用于杂交育种研究^[9-11]。研究过程中发现花粉种间特异性很强,不同作物需要不同技术方案,没有一种技术方案可以适宜所有花粉的保存^[12]。小麦属于禾本科作物,其离体花粉活力几个小时内迅速降低,寿命很短,不利于花粉活力研究和育种工作的开展,目前仅有关于八倍体小黑麦花粉

的保存研究^[12],关于普通小麦花粉保存技术的研究未见成功报道。如果采用低温或超低温冷冻技术延长小麦花粉寿命,为加速小麦杂交育种进程和种质资源的保存提供更好的途径,将会有很大的应用价值。

本研究对小麦花粉进行采集,初步开展了小麦花粉的干燥条件、花粉低温和超低温保存条件以及小麦花粉保存后的复苏及杂交授粉研究等,旨在确立适合的小麦花粉保存方法,为杂交小麦育种,尤其是跨时间、跨地区的杂交育种提供方便,同时为禾本科作物花粉的长期保存提供理论依据和借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试小麦材料为镇麦168和宁麦13。分别于2020年和2021年11月上旬种植于荃银高科种业股份有限公司合肥南岗试验田和滁州市定远县东昌试验田,其中镇麦168集中种植于南岗试验田用于花粉采集,宁麦13同时种植于两地(南岗试验田和东昌试验田),采用常规田间管理。

1.2 花粉收集和干燥 2021年和2022年4月上旬镇麦168小麦盛花期,选择晴朗天气,于10:00-12:00和16:00-18:00利用自制花粉采集装置^[13]采集花粉至培养皿中,并迅速带回实验室内进行干燥处理(温度20℃、湿度25%)。设置5种干燥处理时间:0h、1h、1.5h、3h、5h。

1.3 花粉保存和复苏 取不同干燥时间的花粉,将对应培养皿进行密封并装入铝箔复合袋中,设3种温度条件:4℃(4℃冰箱低温冷藏保存)、-20℃

基金项目:合肥市生物育种产业技术创新战略联盟;安徽省科技重大专项(201903a06020011)

通信作者:张从合

(-20°C 冰箱低温冷冻保存)和 -196°C (液氮超低温冷冻保存)。间隔不同时段(2d、4d、7d和368d)后取出花粉进行花粉复苏。复苏方式分别为自来水冲洗复苏、室温自然复苏(25°C)和 35°C 水浴复苏,待保存花粉复苏至室温后进行杂交授粉试验。

1.4 杂交授粉 提前对两地种植的宁麦 13 进行剪穗去雄并套袋,将不同处理的复苏后花粉授粉于袋中的宁麦 13 穗子,授粉后继续套袋隔离,每个处理设置 20 次重复。

1.5 调查指标及数据分析 授粉后,待成熟期调查统计小麦每穗结实粒数;所有试验数据均采用 Excel 软件进行统计和分析。

2 结果与分析

2.1 干燥时间对小麦花粉授粉效果的影响 为了确定合适的花粉干燥时间,将花粉经过不同时间的干燥后,分别置于 4°C 、 -20°C 和 -196°C 保存 2d,采用室温(25°C)自然复苏花粉并进行杂交授粉,用新鲜花粉(干燥 0h 未保存)作为对照,统计授粉后每穗结实粒数。结果如图 1 所示,在温度 20°C 、湿度 25% 下干燥 0h、1h、1.5h、3h 和 5h 的花粉授粉均有结实,其中干燥 0h、1h 和 1.5h 每穗结实粒数差异不大,分别为 28 粒、27 粒和 24 粒,干燥 3h 之后已严重影响授粉结实,干燥 5h 每穗结实数仅为 1 粒; 4°C 保存花粉除了干燥 0h、1h 有结实外,其余处理均无结实; -20°C 和 -196°C 保存的花粉干燥 0h 和 1h 每穗结实数均超过 20 粒,干燥 1.5h 之后随着干燥时间的延长,每穗结实粒数逐渐降低,干燥 5h 保存 2d 后授粉不结实。

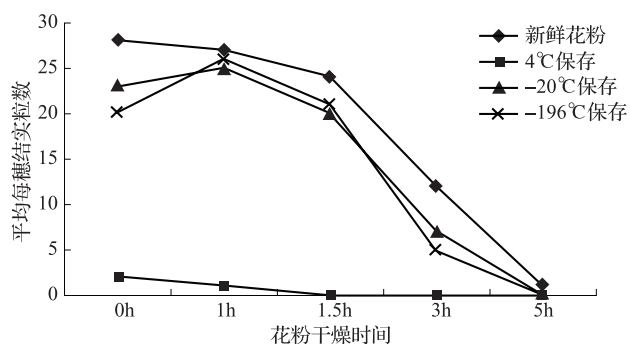


图1 不同干燥时间和保存条件对小麦授粉结实的影响

可见,花粉干燥时间对不同保存条件下小麦花粉授粉效果的影响较大。干燥 3h 之后的花粉可能由于含水量过低导致花粉活力降低影响保存后授粉

结实,干燥 0h、1h、1.5h 均可进行 -20°C 和 -196°C 保存,其中干燥 1h 对花粉活力影响最小,保存授粉结实效果最好。 4°C 保存条件下除了 0h、1h,其余干燥时间均不结实,达不到育种需求。因此干燥 1h 是低温冷冻和超低温冷冻保存花粉高活力的最优干燥时间。

2.2 不同解冻复苏处理方式对每穗结实粒数的影响 取干燥 1h 的 4°C (低温冷藏)、 -20°C (低温冷冻)和 -196°C (超低温冷冻)保存 2d 的花粉,分别用自来水冲洗复苏、室温(25°C)自然复苏和 35°C 水浴复苏 3 种方法进行花粉复苏处理,并授粉于去雄的宁麦 13 进行杂交试验。结果如图 2 所示, -20°C 保存后采用室温(25°C)自然复苏平均每穗结实粒数最高,其次是 35°C 水浴复苏,而采用自来水冲洗复苏花粉授粉平均每穗结实粒数最低。 -196°C 保存后采用 35°C 水浴复苏平均每穗结实粒数最高,其次是室温(25°C)自然复苏,采用自来水冲洗复苏花粉授粉平均每穗结实粒数最低。 4°C 保存后花粉不同复苏方式的结实粒数均较低。其中 -20°C 保存的花粉室温(25°C)自然复苏与 35°C 水浴复苏授粉平均每穗结实粒数仅相差 2 粒, -196°C 保存的花粉室温(25°C)自然复苏与 35°C 水浴复苏授粉平均每穗结实粒数仅相差 1 粒,但这两种复苏方法的授粉平均每穗结实粒数均高于自来水冲洗复苏。可见,采用室温(25°C)自然复苏是简便适合的小麦花粉复苏方式。

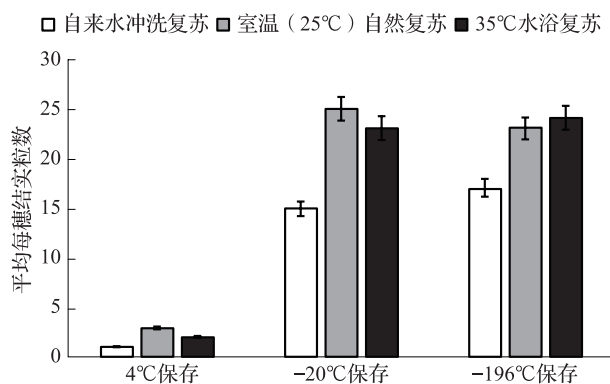


图2 不同复苏方式对小麦授粉结实的影响

2.3 不同保存时间对每穗结实粒数的影响 将收集的镇麦 168 花粉在温度 20°C 、湿度 25%、干燥 1h 后,分别于 4°C 、 -20°C 以及 -196°C 保存 2d、4d、7d 和 368d,取出进行室温(25°C)自然复苏并授粉

去雄的宁麦 13。结果如图 3 所示,4℃保存 2d 的花粉授粉后平均每穗结实粒数仅 2 粒,保存至 4d 之后均不结实; -20℃保存 7d 之内授粉平均每穗结实粒数变幅在 21~23 粒之间,但保存 1 年(368d)之后的花粉授粉结实粒数明显降低;而 -196℃保存 2d 至 368d 的花粉授粉后平均每穗结实粒数变幅在 22~25 粒之间,无明显变化。可见,4℃除了保存 2d 有结实外,其余均不结实,达不到育种需求; -20℃(低温冷冻)环境可短期(7d)保存小麦花粉;而 -196℃(超低温冷冻)则适宜花粉的长期(368d)保存。

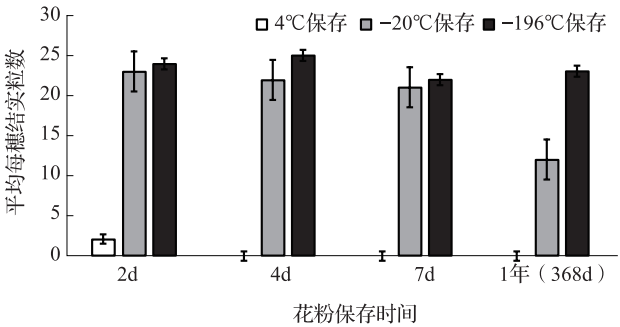


图 3 不同保存时间对小麦授粉结实的影响

2.4 保存花粉异地授粉及杂交种真实性验证 为了验证 -20℃(低温冷冻)和 -196℃(超低温冷冻)的花粉在其他地区授粉结实的可行性,将 -20℃和 -196℃保存 7d 的花粉放入存有干冰的低温保温箱中,从合肥运至滁州市定远县东昌试验田,进行花粉室温(25℃)复苏后授粉于去雄的宁麦 13,结果如表 1 所示,定远与合肥平均每穗结实粒数基本无差异,且与新鲜花粉授粉平均每穗结实粒数相差不大,仅相差 1~4 粒,得出小麦花粉经过 -20℃和 -196℃保存后可进行异地授粉。为了验证试验结果的可靠性,避免由于去雄不干净自交导致的试验误差,进一步对两地收获的杂交 F₁ 种子进行真实性验证,利用 NY/T 2470—2013《小麦品种鉴定技术规程 SSR 分子标记法》进行检测,结果表明杂交 F₁ 种子真实性均达到 96.0% 以上,试验结果准确可靠。

3 讨论与结论

杂交小麦被认为是缓解极端天气、提高小麦综合生产能力的重要途径^[14-15],已陆续审定了一批杂交小麦品种,并在生产上推广应用,如 2008 年绵杂麦 168 以 8565kg/hm² 的产量刷新了四川盆地小麦单产新纪录^[14]。但是杂交小麦在应用中仍然存在着一些有待解决的科学和产业问题,其中规模化高效制种技术就是杂交小麦大面积推广的重点和难点。为此,团队提出将小麦花粉进行集中收集并在特殊的条件下保存,进而延长花粉寿命,可拓宽小麦配组育种的双亲生育期的差距,并拓宽杂交小麦的遗传距离,为小麦育种的授粉杂交提供了方便,利于加速育种进程。同时,对于小麦产业特别是降低制种成本,克服杂交制种花期不育或花时不同步,提高土地利用效率,提高机械化水平,完善种质资源的保存以及提升杂交小麦的杂种优势利用等都具有非常重要的价值。

花粉干燥处理是低温冷冻和超低温保存花粉高活力的关键因素,不干燥或含水量过高花粉在结冻和化冻的过程中容易产生冰晶使细胞膜受损,而干燥时间过长又会导致花粉活力降低,导致低温保存后的活力更低^[12]。在农作物花粉的研究中,胡晋等^[16]研究水稻花粉在 10℃干燥 3h 较适宜水稻恢复系花粉的超低温保存。孙果忠^[17]研究得出花粉含水量在 11.3%~14.7% 范围是玉米花粉超低温保存成功的关键。本研究通过采集小麦花粉,采用在温度 20℃、湿度 25% 条件下进行干燥处理,得出干燥 1h 再低温冷冻保存和超低温保存授粉后平均每穗结实粒数与对照基本相同。

花粉超低温保存后复苏化冻处理也是决定花粉活力高低的关键因素,较好的复苏方式既能避免化冻过程中水的渗透冲击对细胞膜体系的破坏,又能防止花粉细胞内的再次结冰^[12]。王彩红等^[18]采用不同温度复苏杏花粉,得出含水量越高的材料复苏温度越高。本研究初步得出 -196℃保存的小麦

表 1 花粉保存后异地授粉结实及杂交种真实性

地点	新鲜花粉(CK)		-20℃保存		-196℃保存	
	平均每穗结实粒数	真实杂交种数	平均每穗结实粒数	真实杂交种数	平均每穗结实粒数	真实杂交种数
合肥	28	27	25	25	24	24
定远	27	27	24	24	26	25

花粉适宜 35℃ 水浴复苏, -20℃ 保存的花粉则更适宜室温(25℃)自然复苏。

本研究采用储存后花粉直接进行杂交授粉的方法,虽然不能非常精确反映出花粉生活力^[19],但这是最能指导实际生产的方法,也是最有效的检测方法。本试验中不同保存条件对花粉的授粉结实影响不同,4℃ 低温冷藏环境不利于小麦花粉保存, -20℃ 低温冷冻保存随着保存时间延长至 7d,花粉授粉结实粒数较对照无明显变化,花粉活力基本不变,而保存时间延长至 1 年(368d)花粉活力明显降低,得出 -20℃ 有利于花粉的短期(7d)保存。由于 7d 和 368d 间隔时间过大, -20℃ 是否适合 7d 以上的保存时间还有待进一步的研究。-196℃ 液氮保存 1 年(368d)对花粉的授粉效果影响不大,说明 -196℃ 适宜花粉的长期保存。在生产中可以根据不同目的选择经济合适的保存方法。本研究对小麦花粉进行低温和超低温保存比较试验,为杂交小麦制种提供了重要的技术支撑。

团队初步研究了小麦花粉低温冷藏、低温冷冻保存和超低温冷冻保存技术,首先对小麦花粉进行短期和长期保存,研究保存后的花粉对杂交授粉结实影响,发现小麦花粉低温冷冻保存和超低温冷冻保存具有可行性。初步结论如下:(1)小麦花粉不干燥(干燥 0h)可以直接进行低温冷冻和超低温保存;在温度 20℃、湿度 25% 条件下,干燥 1h 是低温冷冻和超低温保存后花粉高活力的最优干燥时间。(2)4℃ 不利于小麦花粉的保存, -20℃ (低温冷冻)可短期(7d)保存小麦花粉, -196℃ (超低温冷冻)适宜花粉的长期(368d)保存。(3) -20℃ (低温冷冻)保存小麦花粉的最佳复苏方式是室温(25℃)自然复苏; -196℃ (超低温冷冻)保存小麦花粉的最佳复苏方式是 35℃ 水浴复苏,综合采用室温(25℃)自然复苏是简便适合的小麦花粉复苏方式。(4)小麦花粉低温冷冻和超低温冷冻保存后,可异地授粉。

参考文献

[1] 陈晓杰,杨保安,范家霖,张福彦,程仲杰,王嘉欢,张建伟. 小麦杂

- 种优势利用研究进展. 种子, 2022, 41 (1): 66-73
- [2] 李先振,丁同龛,谢俊贤. 冬小麦杂种优势利用研究初报. 甘肃农业科技, 1997 (4): 14-15
- [3] 林元洪,黄辉耀. 两系杂交小麦制种高产技术初探. 麦类作物学报, 1998 (2): 4-6
- [4] 王拯,张胜全,叶志杰,任立平,张风延,陈兆波. 杂交小麦种子生产中不同辅助授粉技术研究. 安徽农业科学, 2017, 45 (17): 29-31
- [5] 李绍详,顾坚,田玉仙,刘琨,杨和仙,赵红,杨木军. 云南杂交小麦制种技术研究进展. 种子, 2011, 30 (7): 59-63
- [6] 杨木军,李绍详,刘琨,顾坚,田玉仙,杨和仙,周金生,陈佩度. 云南温光敏两系杂交小麦制种技术研究. 麦类作物学报, 2006 (4): 27-31
- [7] 刘宏伟,马学锋,杨天章. V 型杂交小麦制种技术研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 1993 (3): 6-11
- [8] 张从合,王慧,冯冲,张道林,严志,方玉,周桂香,申广勤,张云虎,陈琳,李方宝,庞战士,王林,刘兴江. 一种禾本科作物杂交种规模化生产的方法. 中国, 109874663B. 2021-01-18
- [9] 张金梅,闫文君,李雪,黄斌,张海晶,赵剑波,姜全,陈晓玲. 桃花粉低温和超低温保存方法比较研究. 植物遗传资源学报, 2017, 18 (4): 670-675
- [10] 张亚利,尚晓倩,刘燕. 花粉超低温保存研究进展. 北京林业大学学报, 2006, 28 (4): 139-147
- [11] 常维霞,姚小华,龙伟. 山茶属 3 种植物花药超低温保存研究. 中国油料作物学报, 2016, 38 (1): 52-57
- [12] 徐翠莲,王瑞清,张俐敏,田依轩,胡文明. 小黑麦花粉干燥法超低温保存技术研究. 湖北农业科学, 2015, 54 (21): 5221-5226
- [13] 张从合,王慧,冯冲,张道林,严志,方玉,周桂香,申广勤,张云虎,陈琳,李方宝,庞战士,王林,刘兴江,汪和廷,杨韦. 一种保持禾本科作物离体花粉高活力的装置. 中国, 212260068U. 2021-01-01
- [14] 张胜全,叶志杰,任立平,高新欢,王拯,杨永利,穆磊,董艳华,陈兆波. “十五”以来我国杂交小麦审定品种分析. 作物杂志, 2022 (1): 38-43
- [15] 赵昌平. 中国杂交小麦研究现状与趋势. 中国农业科技导报, 2010, 12 (2): 5-8
- [16] 胡晋,郭长根. 超低温(-196℃)保存杂交水稻恢复系花粉的研究. 作物学报, 1996, 22 (1): 72-77
- [17] 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. 河北农业科学, 2013, 17 (1): 65-67, 71
- [18] 王彩虹,李嘉瑞. 杏花粉的低温与超低温贮藏研究. 莱阳农学院学报, 1996, 13 (2): 169-173
- [19] 牛国保,董岩,姚星伟,陶秀娟,闫丽,单晓政,孙德领. 不同保存条件下的花粉对花椰菜授粉效果的影响. 蔬菜试验研究, 2020 (3): 15-19

(收稿日期: 2022-07-24)