

黄帝陵古侧柏花粉生活力及其保存方法的研究

王 梦,康永祥\*,王 富,甘明旭

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨陵 712100)

**摘 要:**以黄帝陵千年古侧柏花粉为试验材料,用离体萌发法测定花粉的生活力,研究不同保存方法对花粉萌发率的影响,探讨花粉含水量、投入方式、化冻方式对超低温保存效果的影响。结果表明:古侧柏花粉在 9%蔗糖+0.01%硼酸的培养基中离体培养 4 d 萌发率最高。90 d 内,随着保存时间的延长,室温(20℃)保存的花粉迅速失活,低温(0℃、-20℃)保存的花粉萌发率呈逐渐下降趋势,超低温(-196℃)保存的花粉萌发率最高且保持效果最好,为古侧柏花粉长期保存的适宜方法。在超低温保存中,花粉以未经干燥、直接投入液氮、37℃ 恒温水浴化冻 5 min 保存效果最好;花粉含水量、投入方式、化冻方式之间交互效应显著。

**关键词:**黄帝陵;古侧柏;花粉;生活力;保存方法;超低温保存

**中图分类号:**S791.38      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2016)06-0133-07

Viability and Storage Methods of Ancient *Platycladus orientalis* Pollen  
in Huangdi Mausoleum

WANG Meng, KANG Yong-xiang\*, WANG Fu, GAN Ming-xu

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** The pollen viability of ancient *Platycladus orientalis* in Huangdi Mausoleum were tested by *in vitro* culture method to study the effect of different storage methods on pollen germination and to explore the effect of pollen water content, input and thawing method on the pollen cryopreservation method. The results showed that the pollen germination rate reached the highest after cultured 4 days on the culture medium supplemented with 9% sucrose and 0.01% boric acid. In 90 days, with the extension of storage time, the pollen stored at 20℃ lost its viability quickly, 0℃ and -20℃ could protect the viability of pollen but showed a downward trend overall, cryopreservation had the highest pollen germination rate and kept the best which was the optimal way to achieve the long-term preservation of the ancient *P. orientalis* pollen. In cryopreservation, pollen without drying was directly put into the liquid nitrogen, thawing at 37℃ water to achieve the best storage effect. The interaction effect between pollen water content, input and thawing method was significant.

**Key words:** Huangdi Mausoleum; ancient *Platycladus orientalis*; pollen; viability; storage method; cryopreservation

黄帝陵是中华文明的精神标识,其古柏群是几千年以来的历史遗存,不仅是古老中华文明的“历史见证”、“绿色的文物”,而且是自然赋予人类极其宝贵的种质资源,然而近年来,由于受到气候变化,自

然灾害、病虫害以及人为破坏等多重因素的影响,黄帝陵古柏群生长势日趋衰弱,甚至已经出现死亡<sup>[1-2]</sup>,珍贵种质的流失将是无法弥补的巨大遗憾,因此,保护和延续该优良种质资源的任务迫在眉睫。

收稿日期:2016-04-05    修回日期:2016-06-06  
基金项目:国家林业公益性行业科研专项(201404302)。  
作者简介:王 梦,女,在读硕士,研究方向:古树名木保护。E-mail:meeeng@163.com  
\* 通信作者:康永祥,男,教授,博士,研究方向:树木学及古树名木保护。E-mail:yxkang@nwsuaf.edu.cn

花粉是植物种质资源的形式之一,承载着植物重要的遗传信息,是种质资源保存、交换以及杂交育种的重要材料<sup>[3]</sup>。在自然保存条件下,花粉寿命一般较短,给种质、遗传等研究工作带来极大的不便。因此,在研究珍贵植物花粉生活力的基础上,探索其有效的保存方法,对开展优良种质资源的保存与后续的繁育工作具有重要意义。

花粉的保存涉及花粉生活力的测定,方法主要有染色法、受精力测定法、活体萌发测定法、离体萌发测定法等<sup>[4]</sup>。木本植物花粉的保存方法,主要有低压保存、有机溶剂保存、低温保存、超低温保存等几类<sup>[5]</sup>。不同植物的花粉,其有效保存方法不尽相同<sup>[3,6-7]</sup>。其中超低温法是种质资源保存的一条重要途径,近年来被广泛研究。生物材料在-196℃的极低温度下,新陈代谢活动几乎停止,处于“生机停顿”状态,所以,在理论上可以实现植物种质的长久保存,但也因不同植物材料而异<sup>[8]</sup>。在花粉的超低温保存中,花粉含水量、投入液氮方式、化冻方式的不同,是影响其超低温保存效果的重要因素<sup>[3]</sup>。目前针对其他植物花粉的生活力及保存研究较多<sup>[9-13]</sup>,但关于侧柏(*Platycladus orientalis*)花粉生活力的测定及保存方面在国内尚未见报道,黄帝陵古柏是珍贵稀缺的种质资源,至今尚未见其种质资源保存利用体系的相关研究。本研究以黄帝陵古侧柏花粉为试材,探索了花粉离体萌发的最佳培养条件以及不同保存方法、保存时间对古侧柏花粉生活力的影响,同时对超低温保存方法中的花粉含水量、投入液氮方式、化冻方式 3 个关键因素的相关研究,为开展古树名木珍贵种质资源的保存工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2015 年 3 月 13 日,于陕西省延安市黄帝陵景区陵园内,选取树龄约为 3 000 a 的珍贵古侧柏作为花粉采集对象。用高枝剪剪下即将散粉的侧柏雄球花小枝,装入带孔的硫酸纸袋内,立即用盛有冰袋的保温箱带回实验室进行水培散粉,随时观察散粉情况,并收集花粉。3 月 15 日,将所有花粉充分混匀后用 2 mL 离心管密封包装,放入盛有硅胶的塑封袋中,统一放置于 4℃ 冰柜中暂时保存。

1.2 试验方法

1.2.1 花粉生活力测定方法 花粉生活力的检测采用离体萌发法<sup>[4]</sup>。采用液体培养法,培养液 1 号为蒸馏水,2 号为 0.01% 硼酸,3~12 号分别为不同浓度的蔗糖(0.25%、5%、1%、3%、5%、7%、9%、11%、13%与 15%) + 0.01% 硼酸。用单凹载玻片

进行花粉培养,以确定古侧柏花粉离体萌发的最佳蔗糖浓度与适合萌发统计的最佳培养时间。汲取培养液 2~3 滴于单凹载玻片上,用解剖针将花粉均匀地洒在培养基上,将载玻片放入有加湿滤纸的培养皿里,于 28℃,相对湿度 60% 的人工气候箱内暗培养 2~7 d,保持滤纸湿润。从培养 12 h 开始,定期使用 Olympus BX43 显微镜(日本奥林巴斯公司)在 10×10 倍显微镜下观察花粉管的生长速度与花粉的萌发情况。用显微测微尺测量花粉管长度,每处理重复 3 次,每重复随机镜检 5 个视野,每视野测量花粉管 5 条;萌发率统计以花粉管长度大于花粉粒直径为萌发标准<sup>[14-15]</sup>,每处理 3 次重复,每重复随机镜检 3 个视野,取 9 个视野的萌发率均值为最终萌发率。

萌发率 = (已萌发的花粉粒数 / 总花粉粒数) × 100% (1)

1.2.2 花粉干燥及含水量测定

1.2.2.1 花粉干燥 从 4℃ 冰柜中取出所有花粉,将花粉平均分为 3 等份,第 1 份不做任何处理,将另外 2 份放入 28℃ 恒温箱中分别干燥 2 h 和 4 h,最终获得 3 种含水量水平的花粉,由高到低依次为处理 A1(未干燥)、A2(28℃ 干燥 2 h)、A3(28℃ 干燥 4 h)。

1.2.2.2 花粉含水量测定 采用恒温烘干法<sup>[16]</sup>,取 3 种含水量水平的花粉样品,于温度为 105℃ 的烘箱中烘干 45~60 min,连续烘干 2~3 次直到样品达到恒重。

花粉相对含水量 = [(花粉鲜重 - 花粉干重) / 花粉鲜重] × 100% (2)

1.2.3 花粉保存方法 3 月 15—24 日,花粉均暂存于 4℃ 冰柜中。3 月 25 日从冰柜取出所有花粉,进行干燥处理后开始保存试验,对 3 种含水量水平的古侧柏花粉 A1、A2、A3,于 20℃、0℃、-20℃、-196℃ 4 种温度下各保存 10、30 d 和 90 d。前 3 个保存温度的花粉,采用 2 mL 离心管包装,密封后放入盛有硅胶的自封袋中,分别置于室内阴凉处、0℃ 和 -20℃ 冰箱中保存,共 27 个试验处理,每处理 3 次重复;超低温(-196℃)保存的花粉,采用 2 mL 冻存管包装保存。对影响超低温保存效果的花粉含水量、投入液氮方式、化冻方式 3 个关键技术因素试验设计如下:花粉含水量水平为 A1、A2、A3;投入方式为 B1(直接投入液氮)、B2(-20℃ 冰箱预冻 2 h 后投入液氮);化冻方式为 C1(自来水化冻 5 min)、C2(室温化冻 5 min)、C3(37℃ 恒温水浴化冻 5 min),采用全因子试验设计,共 18 个试验处理,每处理 3 个重复。在保存后的第 10、30、90 天分别取出各温度下的花粉,用筛选过的最佳培养基进行花

粉培养,测定其离体萌发率。运用 SPSS 软件,采用多因素方差分析法分析花粉含水量、投入方式、化冻方式以及 3 者的交互作用对花粉萌发率的影响,并分析每因素与花粉萌发率之间的关系,平均数之间的多重比较采用 LSD(Least significant difference)检验。

2 结果与分析

2.1 古侧柏花粉离体培养条件研究

2.1.1 花粉离体萌发培养基筛选 当蔗糖浓度<0.5%时,花粉只吸水膨胀,很难萌发;当浓度处于1%~9%时,花粉萌发率随蔗糖浓度增加显著增加,由 14.5%增加到 41.5%,于 9%达到最大值;当蔗糖浓度>9%时,花粉萌发率出现了明显的下降,由 41.5%降为 2.4%,可知一定浓度的蔗糖能够提高花粉萌发率,过高和过低都会影响花粉的萌发(图 1)。古侧柏花粉离体萌发的适宜蔗糖浓度为 9%。

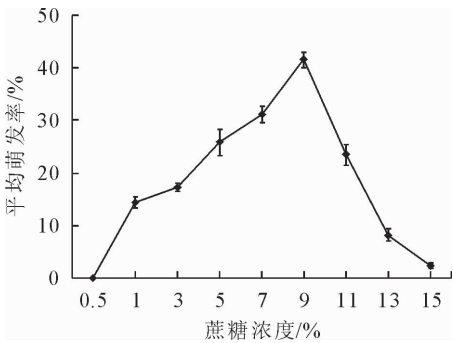


图 1 不同蔗糖浓度对花粉萌发率的影响  
Fig.1 Effects of different sucrose concentrations on pollen germination rate

2.1.2 花粉离体萌发培养时间的研究 9%蔗糖+0.01%硼酸培养基下古侧柏花粉 6 d 内的萌发情况(图 2a)表明,花粉在培养 24 h 内花粉仅吸水膨胀无萌发现象;24~48 h,花粉管出现开始萌发;第 2~4 天,花粉萌发速度加快,总体萌发率迅速提高,由 7.5%上升到 41.5%;第 4~6 天,花粉萌发速度变缓,总体萌发率继续缓慢增加,于第 6 天达到最高值 46.2%。第 5~6 天,花粉萌发率逐渐趋于稳定,但此时培养基蒸发损失严重,影响观察,因此,培养 4~5 d 是进行花粉萌发统计的最佳时期。

古侧柏花粉管 6 d 内的生长试验观察(图 2b)发现,古侧柏花粉粒呈圆球形,直径约 32 μm。第 2~3 天是侧柏花粉管生长速度最快的时期,长度由 12.53 μm 迅速生长到 60.59 μm,约为侧柏花粉直径的 2 倍,此时花粉管在显微镜下已经清晰可辨,达到了镜检标准;第 3~6 天,花粉管持续生长,第 6 天达到 108.42 μm,约为侧柏花粉粒直径的 3.4 倍,但

此时花粉管已互相交织在一起难以计数,所以,培养 4~5 d 最适合花粉萌发的统计。

综合考虑花粉萌发率与花粉管的生长情况,确定离体培养 4~5 d 是进行花粉萌发统计最适宜的时间,后期试验均在培养后第 5 天进行萌发率的统计。

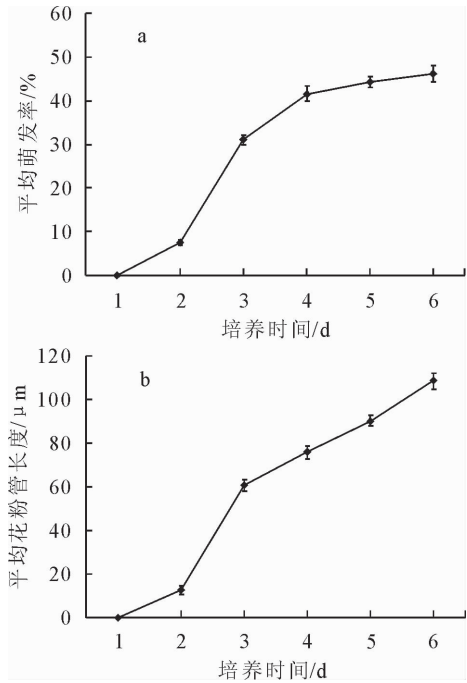


图 2 花粉、花粉管 6 d 内的萌发情况  
Fig.2 Germination,Growth situation of pollen in 6 days

2.2 不同保存方法对古侧柏花粉萌发率的影响

经测定,保存前古侧柏花粉含水量依次为 A1(11.5%)、A2(8.7%)、A3(5.1%)。将这 3 种含水量水平的花粉,分别置于 20℃、0℃、-20℃、-196℃4 种温度下同时保存 90 d,中间分别于第 10、30 天与第 90 天取出花粉,均采用室温化冻后,测定花粉离体萌发情况。结果(表 1,图 3)可以看出,古侧柏花粉含水量水平在一定程度上影响其萌发,在相同保存温度和保存时间下,干燥处理过的花粉 A2、A3,其萌发率情况均低于 A1。相比于含水量的不同,保存温度的差别是影响古侧柏花粉萌发更为重要的因素,温度越低保存效果越好。对于 A1 花粉,开始保存试验 10 d 后,室温保存的花粉萌发率由保存前的 33.2%急速下降为 2.0%,花粉生活力骤减,到后期已经无萌发,萌发率降幅最大;0℃保存花粉 10、30 d 与 90 d,花粉萌发率下降为 21.5%,16.2%与 10.4%;-20℃保存 10、30 d 与 90 d,花粉萌发率下降为 31.4%,29.0%与 19.9%,这 2 种低温条件下花粉的萌发率降幅依然较大;超低温保存 10、30 d 与 90 d,花粉萌发率分别为 50.1%,52.3%与 48.0%,均高于 A1 花粉的初始萌发率 33.2%,

且萌发率表现稳定,不同保存时间后的花粉萌发率

古侧柏花粉的保存显著优于低温和室温保存,是其

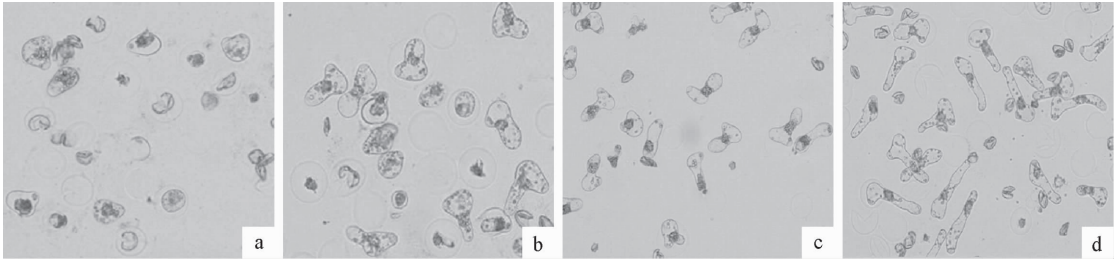
差异不显著,无明显降幅。可知,超低温方法应用于

花粉长期保存的最佳方法。

表 1 不同保存方法对古侧柏花粉萌发率的影响

Table 1 Effects of different storage methods on pollen germination rate

保存温度	含水量	花粉平均萌发率/%		
		10 d	30 d	90 d
20℃	A1	2.0±2.2	0.0	0.0
	A2	1.3±3.4	0.0	0.0
	A3	0.8±1.8	0.0	0.0
0℃	A1	21.5±1.3	16.2±2.1	10.4±1.9
	A2	15.4±1.7	11.5±1.5	6.7±2.4
	A3	10.6±1.2	7.5±0.8	2.3±0.7
-20℃	A1	31.4±1.2	29.0±1.8	19.9±1.1
	A2	21.3±0.5	19.2±2.1	14.4±2.3
	A3	16.4±0.6	11.1±1.4	9.4±1.8
-196℃	A1(B1C2)	50.1±2.3	52.2±1.7	48.0±0.9
	A2(B1C2)	40.8±1.2	35.4±1.1	42.5±1.5
	A3(B1C2)	33.4±0.7	29.4±1.2	32.9±0.7



注:图片 a,b,c,d 分别表示花粉 20℃、0℃、-20℃与-196℃保存后的萌发情况。

图 3 不同保存方法对古侧柏花粉萌发的影响

Fig. 3 Effects of different storage methods on pollen germination

表 2 超低温保存 10~90 d 花粉萌发率情况

Table 2 Pollen germination situation after cryopreservation storage in 10-90 days

处理编号	含水量水平 (A)	投入方式 (B)	解冻方式 (C)	花粉平均萌发率/%		
				10 d	30 d	90 d
1	1	1	1	58.6±1.9	59.7±1.5	55.7±0.6
2	1	1	2	50.1±2.3	52.2±1.7	48.0±0.9
3	1	1	3	64.6±1.1	65.1±0.9	63.8±0.9
4	1	2	1	53.5±1.0	55.2±1.0	50.5±0.7
5	1	2	2	43.0±1.2	47.8±1.0	44.4±1.1
6	1	2	3	60.6±0.8	59.3±1.5	58.4±1.3
7	2	1	1	46.7±2.2	47.9±1.4	45.1±0.7
8	2	1	2	40.8±1.2	35.4±1.1	42.5±1.1
9	2	1	3	45.5±2.4	47.0±0.5	50.1±0.7
10	2	2	1	38.0±0.8	40.2±1.9	36.4±0.9
11	2	2	2	32.3±0.5	33.4±1.3	34.9±0.3
12	2	2	3	33.6±1.1	39.7±0.9	38.9±0.5
13	3	1	1	39.2±2.1	37.7±0.5	36.8±0.7
14	3	1	2	33.4±0.7	29.4±1.2	32.9±0.3
15	3	1	3	37.7±1.6	36.9±0.3	38.5±0.6
16	3	2	1	29.2±1.7	34.2±0.4	32.4±0.3
17	3	2	2	30.4±0.6	24.6±1.0	25.0±0.6
18	3	2	3	26.2±0.4	29.6±1.3	30.3±1.1

2.3 超低温保存不同处理对古侧柏花粉萌发率的影响

18 个处理的古侧柏花粉经超低温保存 10、30 d 与 90 d,保存效果较好的处理为 1、3 号与 6 号,花粉萌发率均达 55% 以上。其中,3 号处理 A1B1C3 表现最好,保存 10、30 d 与 90 d 后,花粉萌发率依次为 64.6%、65.1% 和 63.8%,显著高于花粉保存之前的初始萌发率,且随着保存时间的延长,萌发情况表现出较为稳定的特征。效果较差的处理为 14、16、17 号与 18 号,萌发率均在 35% 以下(表 2)。

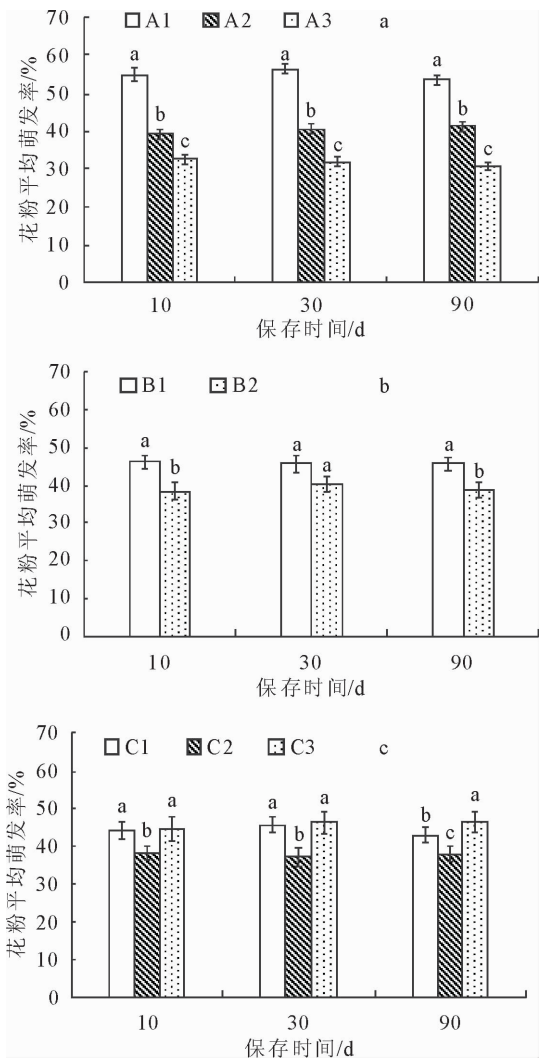
在 3 种含水量水平中,不同的保存时间下花粉萌发率均表现为 A1>A2>A3(图 4a),且差异显著( $P<0.05$ );在 2 种投入方式和 3 种化冻方式中,花粉萌发率表现为 B1>B2,C3>C1>C2,保存时间不同,结果间的差异显著性有些变化(图 4b、图 4c)。A1、B1、C3 是 3 个试验因素中各自最适宜的水平,且不受花粉保存时间的影响。主效应及交互效应检验也表明,花粉含水量、投入方式、化冻方式对古侧柏花粉超低温保存后的萌发率均有显著影响,且 3 者之间的交互作用对花粉萌发率也产生显著影响。因此,采用超低温法保存古侧柏花粉,对自然散粉后的花粉无需进行干燥处理,不预冷直接投入液氮中,保存一定时间取出后,采用 37℃ 恒温水浴化冻 5 min 是适宜的超低温保存技术程序,可使古侧柏花粉的超低温长期保存达到最佳效果。

3 结论与讨论

蔗糖是花粉萌发及花粉管壁合成的主要营养物质,是影响花粉萌发的重要因子<sup>[17-19]</sup>。本试验采用液体培养法,研究了不同蔗糖浓度、不同培养时间对古侧柏花粉萌发率的影响,结果表明其花粉离体萌发的最适蔗糖浓度为 9%,于 28℃、相对湿度 60% 的人工气候箱内暗培养 4 d 是进行花粉萌发统计的最佳培养时间。试验中古侧柏花粉萌发很慢,在培养 24 h 以后才开始萌发,萌发时间持续 7 d 左右,这与银杏、油杉、黑松等裸子植物花粉的萌发研究较为一致<sup>[11,20-21]</sup>,而许多被子植物的花粉萌发以及花粉管生长均较快<sup>[22-24]</sup>,这可能与裸子植物花粉含水量低、花粉粒中缺乏多聚核糖体以及花粉管伸长时对一些蛋白质合成的依赖等因素有关<sup>[25]</sup>。

超低温法进行古侧柏花粉的保存工作是实现其长久保存的最佳方法。干燥处理未能提高古侧柏花粉的耐贮藏能力,可能因为古侧柏花粉原始含水量已经相对较低(11.5%),干燥处理产生了一定的脱水伤害,影响了花粉的活力。

古侧柏花粉经超低温保存后,其萌发率要高于



注:不同小写字母示结果间差异显著( $P<0.05$ )。

图 4 超低温保存下不同含水量对花粉萌发的影响

Fig. 4 Effects of different water contents on pollen germination under cryopreservation

保存之前,这种“冷刺激”现象在其他花粉超低温保存中也有发生,目前具体机理尚有待继续研究<sup>[23]</sup>。在花粉的超低温保存技术中,花粉含水量、投入方式、化冻方式是最关键的 3 个因素。液氮保存对植物材料产生的伤害是在投入液氮和取出化冻的 2 个急速变温的过程中,在经历-10~-140℃ 的温度范围时,“冰晶”的大量生成与增长,从而对花粉产生伤害<sup>[5]</sup>。投入液氮前对花粉进行预冷处理,可以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,从而避免胞内结冰对原生质的损害,但预冷效果因植物种类和花粉含水量的不同而有较大差异<sup>[3,26-27]</sup>。本试验通过对比 2 种投入冰冻方式,得出古侧柏花粉不经预冷,直接投入液氮中保存效果更好,这可能与古侧柏花粉本身含水量相对较低有关。直接投入液氮,花粉细胞内的水分来不及成冰迅速冷却达到玻璃化状态,从而提高了保存的存活



率,而预冷处理可能对含水量较高的花粉更具有保护性<sup>[3]</sup>;在3种化冻方式的研究中,37℃恒温水浴化冻5 min测得花粉的萌发率最高,这可能因为30~40℃的温水浴化冻,可使花粉细胞迅速通过-50~-10℃的结冰危险温度区,避免细胞内再次结冰,从而提高了保存的存活率<sup>[28]</sup>;在3种含水量水平的对比中,干燥后的花粉超低温萌发率低于原含水量花粉,古侧柏花粉不必经过脱水干燥即可实现液氮保存,与红桤木、番茄、魔芋等植物花粉的超低温研究结果相似<sup>[14,27,29]</sup>,可能与不同植物花粉自身含水量与耐干燥程度不同有关<sup>[30]</sup>。此外,试验中随着保存时间的延长,超低温保存效果表现稳定,保存后测得花粉萌发率始终维持在较高水平。综上所述,在古侧柏花粉的超低温保存实践应用中,对自然散粉后的花粉,无需进行干燥处理,不预冷直接投入液氮保存,取出后用37℃恒温水浴化冻5 min,可以使古侧柏花粉获得最好的保存效果,且可以满足其长期保存的需求。

参考文献:

[1] 杨玲,郭剑萍,刘建军. 黄帝陵古柏保护研究概述[J]. 福建林业科技,2014,41(3):239-242.  
YANG L, GUO J P, LIU J J. Review on ancient *Platycladus orientalis* protection in the Huangdi Mausoleum[J]. Journal of Fujian Forestry Science and Technology, 2014, 41(3): 239-242. (in Chinese)

[2] 杨玲,康永祥,李小军,等. 黄帝陵古柏群林下天然更新研究[J]. 西北林学院学报,2015,30(1):82-86.  
YANG L, KANG Y X, LI X J, *et al.* Natural regeneration of the ancient *Platycladus orientalis* in the Mausoleum of the Yellow Emperor[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2015, 30(1): 82-86. (in Chinese)

[3] 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.  
ZHANG Y L, SHANG X Q, LIU Y. Advances in research of pollen cryopreservation[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2006, 28(4): 139-147. (in Chinese)

[4] 王钦丽,卢龙斗,吴小琴,等. 花粉的保存及生活力测定[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]. Bulletin of Botany, 2002, 19(3): 365-373. (in Chinese)

[5] 王改萍,徐涛,彭方仁. 木本植物花粉的保存研究进展[J]. 林业科技开发,2007,21(6):9-11.  
WANG G P, XU T, PENG F R. Advances on pollen preservation of woody plants[J]. China Forestry Science and Technology, 2007, 21(6): 9-11. (in Chinese)

[6] 李嘉瑞,王彩虹. 杏花粉的低压保存研究[J]. 西北农业大学学报,1996,24(3):1-4.  
LI J R, WANG C H. Preservation of apricot pollen under hypobaric atmosphere [J]. Journal of Northwestern Agricultural U-

niversity, 1996, 24(3): 1-4. (in Chinese)

[7] 刘国俭,张新忠,杨秀梅. 几种果树花粉有机溶剂保存的研究[J]. 河北林果研究,1998,13(4):339-342.  
LIU G J, ZHANG X Z, YANG X M. Preservation of pollen in organic solvents of several fruit species. [J]. Hebei Journal of Forestry and Orchard Research, 1998, 13(4): 339-342. (in Chinese)

[8] 林复荣,顾万春. 植物种质资源设施保存研究进展[J]. 世界林业研究,2004,17(4):19-23.  
LIN F R, GU W C. Research progress of plant germplasm in vitro conservation[J]. World Forestry Research, 2004, 17(4): 19-23. (in Chinese)

[9] 冯岚,洪香香,方升佐. 青钱柳花粉生活力及耐贮藏性的研究[J]. 北京林业大学学报,2010,32(4):121-125.  
FENG L, FU X X, FANG S Z. Pollen viability and storability of *Cycloarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2010, 32(4): 121-125. (in Chinese)

[10] 王改萍,彭方仁,徐涛. 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:自然科学版,2008,32(5):123-126.  
WANG G P, PENG F R, XU T. Studies on pollen germination and cryopreservation method in different species of catalpa [J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science Edition, 2008, 32(5): 123-126. (in Chinese)

[11] 胡君艳,李云,孙宇涵,等. 银杏花粉生活力测定及贮藏方法的优化[J]. 中国农学通报,2008,24(5):148-153.  
HU J Y, LI Y, SUN Y H, *et al.* Optimization of the pollen vitality identification and storage methods of *Ginkgo biloba* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(5): 148-153. (in Chinese)

[12] 马建伟,王军辉,张守攻,等. 云杉花粉的贮藏及萌发研究[J]. 林业科学研究,2012,25(3):302-307.  
MA J W, WANG J H, ZHANG S G, *et al.* Study on storage and bourgeoning of spruce pollen[J]. Forest Research, 2012, 25(3): 302-307. (in Chinese)

[13] 耿兴敏,黄蓓丽,罗凤霞. 唐菖蒲花粉低温保存过程中的生理生化特征[J]. 西北植物学报,2011,31(7):1417-1421.  
GENG X M, HUANG B L, LUO F X. Physio-biochemical characteristics of gladiolus pollen during cold storage[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2011, 31(7): 1417-1421. (in Chinese)

[14] 周楠楠,方炎明,马成涛. 红桤木花粉生活力及其贮藏方法的研究[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2010,34(5):34-38.  
ZHOU N N, FANG Y M, MA C T. Red alder pollen viability and the effects of different storage methods[J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science Edition, 2010, 34(5): 34-38. (in Chinese)

[15] 王玲,祝朋芳,毛洪玉. 不同培养基及不同贮藏条件对金娃娃萱草花粉生命力的影响[J]. 西北林学院学报,2009,24(3):95-97.  
WANG L, ZHU P F, MAO H Y. Viability of the pollen of *Hemerocallis hybridus* under different media and storage conditions[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2009, 24(3): 95-97. (in Chinese)

- [16] 陈建勋,王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. 广州:华南理工大学出版社,2002.
- [17] 杜玉虎,张绍铃,姜雪婷,等. 果梅花粉离体萌发及花粉管生长特性研究[J]. 西北植物学报,2006,26(9):1846-1852.  
DU Y H,ZHANG S L,JIANG X T,*et al.* Characteristics of pollen germination and pollen tube growth of *Prunus mume* in vitro[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2006, 26 (9):1846-1852. (in Chinese)
- [18] 刘俊梅,李研,张红. 银杏花粉的萌发及其内部微丝骨架骨的研究[J]. 农业生物技术学报,2001,9(4):402.  
LIU J M,LI Y,ZHANG H. Pollen Germination of *Ginkgo biloba* L. and study on distribution of F-actin in germinated pollen[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2001, 9 (4): 402. (in Chinese)
- [19] 赵长星,刘成连. 培养基种类及蔗糖浓度对部分果树花粉发芽率的影响[J]. 河北林果研究,2001,16(3):240-243.  
ZHAO C X,LIU C L. Elemntary studies on measuration of Life-ability of fruit tree pollen[J]. Hebei Journal of Forestry and Orchard Research,2001,16(3):240-243. (in Chinese)
- [20] 李国平,黄群策. 油杉花粉个体发育与传粉过程[J]. 林业科学,2006,42(5):42-47.  
LI G P,HUANG Q C. Ontogeny of pollen and pollination in *Keteleeria fortunei*[J]. Scientia Silvae Sinicae,2006,42(5): 42-47. (in Chinese)
- [21] 李国平,黄群策,杨鹭生,等. 黑松花粉体外萌发与花粉管生长的研究[J]. 林业科学研究,2007,20(2):224-229.  
LI G P,HUANG Q C,YANG L S,*et al.* In vitro pollen germination and pollen tube growth of *Pinus thunbergii*[J]. Forest Research,2007,20(2):224-229. (in Chinese)
- [22] 崔贵梅,孙毅,郝曜山,等. 玉米花粉体外萌发方法改进及其对花粉介导转基因的作用[J]. 植物学报,2012,47(2):155-161.  
CUI G M,SUN Y,HAO Y S,*et al.* The improvement of maize pollen in vitro germination method and its role in pollen-mediated plant genetic transformation[J]. Bulletin of Botany,2012,47(2):155-161. (in Chinese)
- [23] 刘燕,张亚利. 梅花花粉超低温保存研究[J]. 北京林业大学学报,2004,26(Supp. 1):22-25.  
LIU Y,ZHANG Y L. Pollen cryopreservation of *Prunus mume*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2004, 26 (Supp. 1):22-25. (in Chinese)
- [24] 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.  
LI B L,SHANG X Q,LIU Y. Viability of *Paeonia lactiflora* pollen after four years of cryopreservation[J]. Journal of Beijing Forestry University,2008,30(6):145-147. (in Chinese)
- [25] FERNANDO D D,LAZZARO M D,OWENS J N. Growth and development of conifer pollen tubes[J]. Sexual Plant Reproduction,2005,18(4):149-162.
- [26] TISSERAT B,ULRICH J M,FINKLE B J. Survival of phoenix pollen grains under cryogenic conditions[J]. Crop Science, 1983,23:254-256.
- [27] SACKS E J,STCLAIR D A. Cryogenic storage of tomato pollen;effect on fecundity[J]. HortScience, 1996, 31 (3): 447-448.
- [28] 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. (in Chinese)
- [29] 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 *Amor-phophallus* pollen at low temperature and in liquid nitrogen [J]. Acta Horticulturae Sinica,2000,27(2):139-140. (in Chinese)
- [30] 刘武林. 花粉的采集、贮藏和生活力的测定[J]. 植物学通报, 1985,3(3):8-12.  
LIU W L. Pollen collection,storage,and the determination of life force [J]. Chinese Bulletin of Botany,1985,3(3):8-12. (in Chinese)