

苹果离体茎尖超低温保存方法的比较

赵艳华 周锡明 吴永杰

(河北省农林科学院昌黎果树研究所, 昌黎 066600)

摘 要: 以苹果离体茎尖为试材, 对 4 种超低温保存方法 (两步降温法、玻璃化法、包埋干燥法和小滴冰冻法) 从操作程序、存活率、再生率及恢复生长速度等方面进行比较, 确定包埋干燥法为最佳保存方法。

关键词: 苹果; 超低温; 方法;

中图分类号: S 661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 06-0719-03

1 目的、材料与方法

超低温保存作为一种长期保存方式已逐步得到人们的认可。苹果离体茎尖两步降温法、玻璃化法、包埋干燥法及小滴冰冻法等 4 种超低温保存方法均有报道^[1~4]。但这些研究仅限于某一种方法保存某几个品种, 并未对几种方法进行系统比较。本试验拟从操作程序、存活率、有效存活率及恢复生长速度等方面入手, 筛选出一种简便、可靠、有效的苹果超低温保存方法。

试验着重选择了不同苹果类型, 包括品种和砧木 (表 1)。材料为继代培养 70 d、5℃光照培养箱低温驯化 21 d 的试管无性系。继代培养基为 MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L + 糖 30 g/L + 琼脂 5 g/L, pH 5.6。(25±2)℃、光照强度 2000 lx 条件下培养。利用包埋干燥法^[3]、小滴冰冻法^[4]、玻璃化法^[2]和两步降温法^[1]保存的茎尖在液氮中保持 24 h 后, 在 25℃水浴中化冻后再培养。每处理 20 个茎尖, 3 次重复。化冻后形成新植株的茎尖数占茎尖总数的百分数为存活率。

2 结果与分析

2.1 超低温保存方法对苹果离体茎尖存活率的影响

用 4 种超低温方法保存苹果离体茎尖, 均获得较高的存活率, 24 个品种 (系) 存活率 75%~95% (表 1)。但由于小滴冰冻法操作过程复杂, 且每个冷冻管处理的茎尖数太少 (仅 10 个), 所以被淘汰。

表 1 超低温保存方法对不同苹果离体茎尖存活率的影响

Table 1 The effect of different cryopreservation methods on the shoot tips regeneration

品种 Cultivars	存活率 Regeneration (%)	保存方法 Methods	品种 Cultivars	存活率 Regeneration (%)	保存方法 Methods
胜利 Shengli	80	SF	普通富士 Fuji	95	ED
金翠 Jincui	91	SF	金冠 Golden Delicious	75	ED, SF, D
嘎啦 Gala	80	V	乔纳金 Jonagold	76	ED
长富 2 Fuji 2	78	V, ED, SF	金标 Criterion	80	ED, D
秋富 1 Fuji 1	82	ED	昌红 Changhong	80	ED
八棱海棠 <i>Malus micromelus</i>	77	ED, V, D	特大富士 Teda Fuji	95	ED
北海道 9 号 HAC 9	83	ED	特红 1 号 Tehong 1	78	V, ED
红星 Red Star	84	ED	陆澳 Mutsu	80	SF, ED
CG80	88	ED	国光 Ralls	75	SF, V, ED
278	79	ED	津轻 Tsugaru	78	SF, D, ED
千秋 Senshu	95	ED	红月 Hongyue	92	V, D, SF
红世界一 Hongshijie 1	80	ED, D	燕山红 Yanshanhong	75	SF, V, ED

注: SF. 两步降温法; V. 玻璃化法; ED. 包埋干燥法; D. 小滴冰冻法。Note: SF. Two-step; V. Vitrification; ED. Encapsulation; D. Droplet.

收稿日期: 2002-12-20; 修回日期: 2003-02-24

基金项目: 国际植物遗传资源研究所资助项目

2.2 超低温保存方法对苹果离体茎尖再生率的影响

利用包埋干燥法、两步降温法和玻璃化法 3 种方法保存了 5 个苹果品种。结果, 玻璃化和两步降温法保存后的茎尖, 除金标品种外, 其余 4 个品种均有不同比例的愈伤组织产生; 但用包埋法保存后 5 个品种直接形成植株, 无愈伤组织产生, 只是八棱海棠和金标品种存活率略有下降 (表 2)。

表 2 3 种超低温保存方法对苹果离体茎尖再生率的影响

Table 2 The effect of three cryopreservation methods on the shoot tips regeneration

(%)

品种 Cultivars	再生方式 Regeneration ways	两步降温法 Two-step		玻璃化法 Vitrification		包埋干燥法 Encapsulation	
		对照	加液氮	对照	加液氮	对照	加液氮
		Control	Cryopreservation	Control	Cryopreservation	Control	Cryopreservation
乔纳金 Jonagold	总再生率 Total regeneration	64	40	82	75	100	76
	直接再生 Direct regeneration	32	33	82	53	100	76
	愈伤组织再生 Callus regeneration	32	7	0	22	0	0
八棱海棠 <i>Malus micromelus</i>	总再生率 Total regeneration	100	71	100	94	100	69
	直接再生 Direct regeneration	100	62	100	83	100	69
	愈伤组织再生 Callus regeneration	0	9	0	11	0	0
富士 Fuji	总再生率 Total regeneration	75	75	100	67	100	67
	直接再生 Direct regeneration	75	66	100	62	100	67
	愈伤组织再生 Callus regeneration	0	9	0	5	0	0
金标 Criterion	总再生率 Total regeneration	89	78	100	88	100	5
	直接再生 Direct regeneration	69	78	100	88	100	75
	愈伤组织再生 Callus regeneration	20	0	0	0	0	0
金冠 Golden Delicious	总再生率 Total regeneration	100	46	100	72	100	86
	直接再生 Direct regeneration	33	23	100	50	100	86
	愈伤组织再生 Callus regeneration	67	23	0	22	0	0

2.3 茎尖剥取的大小

在试验过程中, 两步降温法要求剥取的茎尖非常小, 仅为 1.0 mm, 这样不仅操作时间长, 容易污染, 而且化冻后生长缓慢。玻璃化法剥取茎尖的大小居中, 约 1.5 mm。包埋干燥法最大, 约 2 ~ 2.5 mm, 相比来说操作简单, 再培养生长迅速。

2.4 观察存活需要的时间

乔纳金、八棱海棠、富士和金标 4 个品种经 3 种超低温方法保存后, 化冻再培养。通过对其存活的观察发现, 两步降温法生长缓慢, 平均 12.3 d 才能看出茎尖存活, 玻璃化法和包埋干燥法分别为 9.3 和 3.8 d。另外, 经包埋干燥法超低温保存的八棱海棠茎尖化冻后整个保持绿色, 不需要恢复期。

品种和方法对存活率均有影响, 同一个方法不同品种存活率不同, 也就是说单单就存活率来考虑, 品种不同所适宜的方法不同, 而联系到有效存活率和材料的遗传稳定性, 我们认为, 包埋干燥法可以最大限度地降低遗传变异, 因为在整个超低温保存过程中无引起遗传变异的外源物质存在, 另外再生后基本不形成愈伤组织, 且由茎尖直接形成植株。

两步降温法和玻璃化法由于要求茎尖较小, 操作时间相对延长, 不仅增加污染, 而且超低温保存后外部叶片全部死亡, 只有微小茎尖或顶端分生组织存活, 因此再生困难, 需要较长的恢复期。包埋干燥法可以剥取较大的茎尖, 操作简单。茎尖化冻后整个保持绿色, 不需要恢复期。因此, 综合考虑操作程序、存活率、有效存活率、及恢复生长速度等, 我们认为包埋干燥法为超低温保存苹果离体茎尖的最佳方法。

参考文献:

- 1 常永健, 陈霜莹, 赵艳华, 等. 苹果茎尖超低温保存的研究. 见: 北京中国科学技术协会首届青年学术年会, 北京: 中国科学技术出版社, 1992. 461 ~ 464
- 2 赵艳华, 陈霜莹, 吴永杰, 等. 玻璃化法超低温保存苹果离体茎尖. 见: 北京中国科学技术协会第二届青年学术年会, 北京: 中国农业大学出版社, 1995. 406 ~ 409

- 3 赵艳华, 吴永杰, 陈霜莹, 等. 包埋干燥超低温保存苹果离体茎尖. 园艺学报, 1998, 25 (1): 93~95
- 4 Zhao Yanhua, Wu Yongjie. Cryopreservation of apple in vitro shoot tips by the droplet freezing method. Cryo-letter, 1999, (20): 109~112

Comparison of Four Methods for Apple Shoot Tips in Vitro Freezing

Zhao Yanhua, Zhou Ximing, and Wu Yongjie

(Changli Institute of Pomology, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Changli 066600, China)

Abstract: In this paper, we compared four techniques (two-step freezing, vitrification, encapsulation, droplet) for freezing apple shoot tips in vitro and concluded that encapsulation was the best method in considering operation protocol, survive rate, regeneration rate and regrowth speed.

Key words: Apple; Cryopreservation; Method

黄瓜嫩果皮色与色素含量的关系

孙小镭 王 冰 顾三军* 王志峰 (山东省农业科学院蔬菜研究所, 济南 250100)

Correlations of Immature Skin Color and Pigments in Cucumber

Sun Xiaolei, Wang Bing, Gu Sanjun, and Wang Zhifeng (Institute of Vegetable, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, China)

关键词: 黄瓜; 果皮; 颜色; 叶绿素; 类胡萝卜素

中图分类号: S 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 06-0721-01

试材为不同皮色的 8 个黄瓜品种和以其为亲本配制的 10 个组合。将上述材料设区种植, 每小区 30 株。先按果色差异对照色谱目测分类, 再随机抽样测定色素含量。雌花开花至商品瓜成熟 (约 7~10 d) 取样, 沿果实纵向削下宽 1 cm, 厚 0.2 cm 左右的表皮, 用打孔器 (直径 0.56 cm) 取圆片 20 片, 在 80% 的丙酮液中遮光浸提 24 h, 用 721 型分光光度计比色。

测定结果表明, 黄瓜嫩果果皮色素总含量随绿色的加深而增加, 即深绿皮 70~80 mg/g, 绿皮、黄绿斑驳 41~55 mg/g, 浅绿皮 30~40 mg/g, 黄绿皮 20 mg/g 左右, 黄白皮、白皮 5 mg/g 以下。色素主要由叶绿素和类胡萝卜素组成, 大致为 1:1 (白皮材料除外)。t 测验结果证明, 两种色素含量的相关系数为 0.991^{**}。叶绿素 a 与叶绿素 b 含量的比值为 1:1.7, 因此, 叶绿素 b 含量对果色影响较大, 在实际应用中可只测一种色素的含量表示黄瓜嫩果果色的特性 (表 1)。

表 1 黄瓜果皮颜色与不同色素含量的关系

Table 1 Relativity of fruit colors with different pigments in cucumber (mg/g FM)

品种 Cultivar	代号 Code	嫩果皮色 Skin color	叶绿素 Chlorophyll			类胡萝卜素 Carotenoid	总量 Total
			Chl. a	Chl. b	Chl. a + b		
茌平白黄瓜 Chipingbai Huanggua	w1	白 White	0.820	1.475	2.294	1.632	3.926
海阳白皮 Haiyang Baipi	w2	黄白 Yellow-white	1.154	1.740	2.894	0.825	3.719
乳山白黄瓜 Rushan Baihuanggua	w3	黄白 Yellow-white	1.003	2.232	3.253	1.681	4.934
临清金棒槌 Linqing Jinbangchui	yg	黄绿 Yellow-green	3.796	6.684	10.479	10.629	21.108
	w2 × g1	浅绿 Reseda	6.341	9.293	15.640	15.032	30.672
	w2 × g3	浅绿 reseda	5.910	10.845	16.755	14.991	31.746
	w2 × g4	浅绿 reseda	7.843	13.508	18.009	21.380	39.389
郑城油皮 Tancheng Youpi	g1	绿 Green	9.079	16.051	25.136	23.860	48.996
	g3	绿 Green	9.914	17.420	27.334	26.827	54.161
临沂秋黄瓜 Linyi Qiuhuanggua	w1 × g1	绿 Green	9.050	15.855	24.906	21.810	46.716
	w2 × g2	绿 Green	8.872	14.713	24.584	20.396	43.980
	yg × g3	绿 Green	8.164	14.476	26.798	21.544	48.342
	yg × g4	绿 Green	9.512	18.501	28.013	24.640	52.653
	w3 × g4	绿 Green	7.926	14.629	22.555	19.359	41.914
	yg × g1	黄绿斑驳 Blocky-green	7.728	16.730	24.458	25.061	49.519
	yg × g2	黄绿斑驳 Blocky-green	7.554	13.347	20.903	21.538	42.441
	g2	深绿 Bottle green	13.088	24.434	37.522	38.178	75.700
济宁秋黄瓜 Jining Qiuhuanggua 19-4-2	g4	深绿 Bottle green	12.695	22.587	35.296	34.669	69.965

收稿日期: 2002-07-18; 修回日期: 2003-11-26

基金项目: 国家“八五”、“九五”科技攻关项目 * 现工作单位 Department of Agronomy and Horticulture, University of Nebraska Lincoln.