

无核葡萄与中国野生葡萄杂种的胚挽救技术研究

王 飞 王跃进 周建锡

(西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要: 通过无核葡萄与中国野生葡萄杂交, 获得了 4 个杂交组合的后代植株, 确定了各杂交组合取胚珠培养的最佳时期。1 Flame \times 山葡萄; 2 红宝石 \times 爱莫无核; 3 红宝石 \times 北醇; 4 爱莫无核 \times 山葡萄在授粉后 45 d 取样培养效果较佳; 5 长穗无核白 \times 山葡萄授粉后 30 d; 6 无核白自交在授粉后 35 d 培养效果较佳。以 Nitschs 为基本培养基, 附加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3 + 2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ZT}$, 适合于 1、3、5 号杂交组合; 而 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3 + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ZT}$ 适合 2、4、6 号杂交组合; 胚萌发培养基为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3$, 适合 1、2、3、5、6 号杂交组合, 而爱莫 \times 山葡萄在 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3$ 培养基上表现较佳, 生根培养基为 1/2MS 基本培养基添加 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$, 它适合 1 号与 5 号组合, $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ 适合 4 号与 6 号组合。

关键词: 无核葡萄; 中国野生葡萄; 杂种; 胚挽救

中图分类号: S 661.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 05-1079-04

Breeding Technology of Embryo Rescue in Seedless Grape with Chinese wild Grape

Wang Fei, Wang Yuejin, and Zhou Jianxi

(Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Through crossing between seedless grapes and Chinese wild grapes we got four group hybrid grape seedlings. The best time to harvest the hybrid grapes ovule for embryo rescued were as follows: 45 d after pollination are (1) Flame seedless with *Vitis amurensis*, (2) Ruby seedless with Omo seedless, (3) Ruby seedless with Beichun, (4) Omo seedless with *Vitis amurensis*; 30 d after pollination is (5) Changsui saltanina seedless with *Vitis amurensis*; 35 d after pollination is (6) Self-pollinated saltanina Nitschs medium with additional $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3 + 2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ZT}$ was suitable for cross (1), (3) and (5), but Nitschs medium with additional $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3 + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ZT}$ was suitable for cross (2), (4) and (6). For embryo regeneration Nitschs medium with additional $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + \text{GA}_3 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was suitable for cross (1), (2), (3), (5) and (6), but for cross (4) medium with $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3 + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ was more suitable. 1/2 MS medium adding $0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ were suitable for cross (1) and (5) to acquire embryo rescue plants, but 1/2 MS medium with addition $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ was suitable for cross (2) and (4).

Key words: Seedless grape; Chinese wild grape; Hybrid; Embryo rescue

1 目的、材料与方法

近年来, 选育大粒、优质、抗病的无核葡萄新品种已成为葡萄育种的重要目标^[1]。通过胚培养获得较多的无核葡萄植株^[2~5], 但用无核葡萄与抗性强的中国野生葡萄杂交, 通过胚挽救获得植株的

收稿日期: 2006-01-25; 修回日期: 2006-05-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370993); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2001AA241172)

报道较少。本试验采用与前人不同的无核葡萄与中国野生葡萄杂交组合,采用种间杂交,如红光无核 \times 山葡萄,爱莫无核 \times 山葡萄,长穗无核白 \times 山葡萄,红宝石 \times 北醇;无核葡萄品种间杂交,组合为红宝石 \times 爱莫及自交组合无核白 \times 无核白,根据胚的发育特点进行胚挽救,创造新的葡萄种质资源。试验于2001年在新疆鄯善瓜果研究所葡萄种质资源圃进行,在葡萄开花前去雄,用中国野生葡萄的花粉授粉3次并套袋,在授粉后30、35、40、45、50 d分别采回果穗,培养40 d后转移到胚萌发培养基上,萌发后改用1/2MS培养基。材料与培养基成分见表1和表2。

表 1 各杂交组合特点

Table 1 The character of different crosses combination

代号 Code	杂交组合 Cross combination	母本特性 Character of maternal	父本特性 Character of paternal
1	红光无核 \times 山葡萄 Flame \times <i>V. amurensis</i> Rupr	无核,浆果为红色,糖度高	有核,浆果为绿色,抗炭疽病和抗寒
2	红宝石 \times 爱莫无核 Ruby \times Oimo seedless	无核,浆果为红色,品质好	无核,浆果为绿色,果实糖度高
3	红宝石 \times 北醇 Ruby \times Beichun	无核,浆果为红色,品质好	有核,浆果为绿色,抗寒性强
4	爱莫无核 \times 山葡萄 Oimo seedless \times <i>V. amurensis</i> Rupr	无核,浆果为绿色,糖度高	有核,浆果为绿色,抗炭疽病和抗寒
5	长穗无核白 \times 山葡萄 Long-bunch sultanina \times <i>V. amurensis</i> Rupr	无核,浆果为绿色,穗长品质好	有核,绿色,抗炭疽病和抗寒
6	无核白自交 Self-pollination of sultanina	无核,果绿色糖度高,适应性强	无核,绿色,糖度高,适应性强

表 2 培养基组成 *

Table 2 Composition of media

基本培养基 Media	编号 Code	6-BA (mg \cdot L $^{-1}$)	BA (mg \cdot L $^{-1}$)	GA (mg \cdot L $^{-1}$)	ZT (mg \cdot L $^{-1}$)	糖 Sugar (g \cdot L $^{-1}$)	琼脂 TC agar (g \cdot L $^{-1}$)	酪蛋白 Casein hydrolysate (g \cdot L $^{-1}$)	PVP (g \cdot L $^{-1}$)
Nitschs胚挽救 Embryo rescue	A1	0.5	1.5	0.5	0.1	60	6.5	0.5	0.2
	A2	0.5	2.0	0.5	0.1	60	6.5	0.5	0.2
	A3	0.5	2.5	0.5	0.1	60	6.5	0.5	0.2
Nitschs胚萌发 Embryo gemation	B1	1.0	1.0	0.2	-	30	6.0	0.3	0.1
	B2	1.0	1.5	0.2	-	30	6.0	0.3	0.1
	B3	1.0	2.0	0.2	-	30	6.0	0.3	0.1
1/2MS成苗	C1	0.02	0.20	-	-	20	6.0	-	-
1/2MS regeneration	C2	0.02	0.15	-	-	20	6.0	-	-
	C3	0.02	0.10	-	-	20	6.0	-	-

*: pH 5.8

2 结果与分析

2.1 不同接种时间对胚珠离体培养的影响

从表3可知,1~4号杂交组合取胚珠培养的时间为授粉后40、45、50 d,而5、6号杂交组合取胚珠培养的时间在授粉后的30、35、40 d。前者无论从胚珠的发育还是萌发来看,45 d的效果明显优于40 d和50 d,经方差分析和多重比较4个杂交组合取胚珠培养的时间45 d极显著好于40 d,显著好于50 d。而5号组合则是在授粉后30 d取胚珠培养效果优于35 d和40 d的,6号组合在授粉后35 d的培养效果优于30 d和40 d的。从表3还可看出,1、4、5号父本同是山葡萄,但母本不同,后代胚珠培养的最佳时间不同,1、2号为45 d,而5号为30 d。2、3号母本同是红宝石,但父本不同,它们取胚珠培养的最佳时间为

表 3 接种时间对胚珠离体培养的影响

Table 3 The effect of inoculated time on vitro ovules cultured

代号 Code	接种时期 Inoculated date (d)	胚珠接种数 No. of ovules cultured	胚珠发育率 Development percentage (%)	萌发率 Gemination percentage (%)
1	40	88	31.8	14.2
	45	96	63.5	45.9
	50	94	31.2	28.6
2	40	90	28.2	0
	45	92	63.0	3.4
	50	88	34.0	0
3	40	90	26.7	0
	45	90	51.1	11.0
	50	96	39.6	5.3
4	40	80	30.2	8.0
	45	100	60.0	53.3
	50	92	39.1	30.5
5	30	101	49.5	52.0
	35	95	29.4	7.1
	40	98	15.3	13.3
6	30	85	27.0	43.4
	35	91	66.7	52.9
	40	86	44.2	34.2

45 d, 说明无核葡萄与有核葡萄或无核葡萄之间杂交时, 母本的选择对取样培养影响较大。

2.2 不同胚挽救培养基对无核葡萄及其杂交胚珠培养的影响

表 4显示了不同胚挽救的培养基配方对 6个杂交组合的胚珠发育结果的影响 (胚珠发育是指胚珠个体由小到大, 体积与重量增大 2~3倍, 颜色深绿且饱满), 经方差分析和多重比较, 不同生长调节剂处理达极显著差异, A2、A3与 A1相比表现显著差异, 但 A2与 A3之间无显著差异, 6个杂交组合中, 1、3两组合在 A3培养基发育率 (分别为 77.9%和 56.5%) 比 A2 (分别为 41.8%和 24.5%) 和 A1 (分别为 25.0%和 34.4%) 的效果好。而 2、4、5、6号组合在 A2培养基上胚珠发育效果好。

表 4 不同生长调节剂处理对离体胚珠发育和萌发的影响

Table 4 Influence of different growth regulators on vitro ovules development and germination (%)

代号 Code	发育率 Development percentage			萌发率 Germination percentage		
	A1	A2	A3	B1	B2	B3
1	25.0 (92)	41.8 (91)	77.9 (95)	2.1 (48)	19.6 (46)	40.9 (44)
2	33.0 (85)	55.5 (90)	41.0 (95)	0 (47)	4.6 (44)	8.3 (36)
3	34.4 (90)	24.5 (94)	56.5 (92)	0 (40)	2.3 (44)	8.9 (45)
4	36.6 (93)	54.4 (90)	45.3 (92)	6.3 (48)	56.5 (46)	28.2 (46)
5	33.7 (98)	56.3 (96)	28.0 (100)	1.9 (54)	36.3 (55)	9.0 (55)
6	25.0 (88)	71.7 (85)	42.6 (89)	6.3 (62)	15.6 (64)	25.4 (63)

注: 括号内为接胚数。

Note: The number in bracket is No. of ovules cultured

表 4经方差分析和多重比较, 在 B培养基上萌发率较高的为 4>1>6杂交组合, 平均萌发率分别为 30.3%、17.6%与 13.9%, 其次为 5>3>2杂交组合, 不同处理间差异显著, B3显著大于 B1与 B2, B1与 B2无差异。3号与 2号杂交组合胚的萌发率较低, 均不到 10%, 可能是由于培养基配方不适合 3、2号组合; 或与母本红宝石的遗传特性或其它生理原因有关^[7], 值得进一步探讨。

2.3 不同植物生长调节剂的 1/2MS培养基对杂种成苗的影响

从表 5可知, 6个杂交组合中, 1、4、5、6号组合最后形成苗子, 通过方差分析和多重比较, 杂交组合间达到极显著差异, 2、3组合成苗率为 0, 极显著低于其它 4个杂交组合, 成苗数最多的为 1号组合, 其次为 4>5>6号组合。不同植物生长调节剂间, C2处理要好于 C1与 C3处理, 笔者将 2、3组合萌发的芽子接到成苗培养基上, 培养一周后, 芽子顶部先变褐, 然后向下延续, 随后整个芽子变褐死亡, 其原因可能是 1/2MS成苗培养基不适合 2与 3号组合。

表 5 不同生长调节剂培养基对不同杂交组合成苗的影响

Table 5 The effect of different growth regulators on established plants of different cross (%)

代号 Code	成苗率 Establishment percentage		
	C1	C2	C3
1	53.3 (15)	92 (12)	61.5 (13)
2	0 (3)	0 (3)	0 (2)
3	0 (3)	0 (5)	0 (4)
4	42.8 (14)	40.0 (15)	83.0 (12)
5	70.0 (10)	72.7 (11)	25.0 (12)
6	36.4 (11)	50.0 (8)	60.0 (10)

注: 括号内为接芽数。

Note: The number in bracket is No. of buds cultured

3 讨论

利用无核葡萄的优质、丰产、大粒和中国野生葡萄的抗性强等特点进行杂交, 目的是从后代选出无核优质、抗性强的葡萄新品种和种质资源。但假单性结实的无核葡萄作为母本与有核葡萄杂交存在着胚败育现象, 通过胚挽救技术可克服胚败育, 提高胚萌发及成苗^[2,3,5], 但胚挽救效果^[6~9]受杂种胚败育时间、胚挽救技术等因素影响。因此, 确定胚挽救最佳接种时间是成功的关键^[4,7], 不同的杂交组合, 其胚败育时期、机理不同。Flame x山葡萄、红宝石无核 x爱莫无核、红宝石 x北醇、爱莫无核 x山葡萄在授粉后 45 d取样培养效果优于 40 d或 50 d, 而长穗无核白 x山葡萄为授粉后的 30 d, 无核白自交为授粉后的 35 d培养效果优于其它时间。接种太早或太迟, 均不利于胚的挽救, 接种太早, 胚未充分发育; 接种太晚, 胚已死亡。因此确定最佳接种时间应在胚发育程度最高, 存活率最高

时进行培养,从细胞解剖学上研究则是在心形胚中后期进行培养效果较佳^[8,10],此时,胚挽救成功率较高,且培养的苗子健壮,移栽成活率高^[11,12]。

在胚挽救过程中,根据胚的发育与败育特点,本研究采用了3个培养阶段,选用了3类培养基配方,即胚挽救、萌发、成苗培养基,胚挽救与萌发培养基,均以Nitschs培养基为基础,附加不同的激素处理,在第1阶段胚挽救培养基中,由于此时胚发育程度较低,基本处于多细胞时期和球形胚时期,属于异养阶段^[8],此阶段胚主要依赖于胚乳及周围的母体组织吸取养分,而母体组织又从培养基中吸取养分,所以胚挽救培养基加入了氨基酸含量丰富的酪蛋白和不同配比的激素,而且糖浓度(6%)较高,目的是防止胚过早萌发,使胚处于高渗液的培养基中,利于胚的发育与增重^[9],当胚发育40d左右时,胚的重量和体积是接种开始的3~4倍时,转入第2阶段胚萌发培养基中,为了促使胚萌发,减少了糖、生长素与酪蛋白的量,增加了细胞分裂素6-BA的量,目的是促使胚的萌发,一旦芽子萌发,将其转移到1/2MS培养基上,去除细胞分裂素6-BA,增加生长素BA的量,利于苗子快速与健壮生长。

参考文献:

- 王跃进, Lamikanra O. 葡萄无核基因的 RAPD 标记的序列分析. 西北农业大学学报, 1997, 24 (5): 820~822
Wang Y J, Lamikanra O. Analysis of sequencing the RAPD marker linked to seedless genes in grape. Acta Univ. Agric Boreali-Occidentalis, 1997, 24 (5): 820~822 (in Chinese)
- Cain D W. In-ovule embryo culture and seedling development of seeded and seedless grapes. Vitis, 1983, 22: 9~14
- Rammin D W. The use of embryos culture in fruit breeding. HortScience, 1990, 25 (4): 395~398
- David W R, Richard E, Ronald T. A stenospemocarpic, seedless *Vitis vinifera* × *Vitis rotundifolia* hybrid developed by embryo rescue. HortScience, 2000, 35 (4): 732~734
- 李桂荣, 王跃进, 唐冬梅, 王西平, 骆强伟. 无核白胚挽救育种技术研究. 西北植物学报, 2001, 21 (3): 432~436
Li G R, Wang Y J, Tang D M, Wang X P, Luo Q W. The studies on embryo rescue techniques of Thompson seedless grape. Acta Bot, 2001, 21 (3): 432~436 (in Chinese)
- 赵密珍, 苏家乐, 钱亚明, 王壮伟, 刁曼妮. 红宝石无核葡萄胚珠培养成苗技术研究. 果树学报, 2005, 22 (2): 166~168
Zhao M Z, Su J L, Qian Y M, Wang Z W, Diao M N. Technology of ovule culture for Ruby seedless grape cultivar. Journal of Fruit Science, 2005, 22 (2): 166~168 (in Chinese)
- 赵月玲, 程贯召, 王汉海. 无核葡萄的育种与胚挽救的应用. 生物学通报, 2004, 39 (9): 15~17
Zhao Y L, Cheng G Z, Wang H H. Application on seedless grape's breeding and embryo rescue techniques. Bulletin of Biology, 2004, 39 (9): 15~17 (in Chinese)
- 王 飞, 王跃进, 周会玲, 万怡震, 杨进孝. 无核葡萄与中国野生葡萄杂种胚发育的细胞学研究. 西北农林科技大学学报, 2005, 33 (3): 61~66
Wang F, Wang Y J, Zhou H L, Wan Y Z, Yang J X. Cytological study of embryo development and abortion in hybrid progeny of seedless grape and Chinese wild grapes. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, 2005, 33 (3): 61~66 (in Chinese)
- 王 飞, 王跃进, 万怡震, 任 杰. 无核葡萄与中国野生葡萄杂种胚败育的某些生理生化变化. 园艺学报, 2004, 31 (5): 651~653
Wang F, Wang Y J, Wan Y Z, Ren J. Some physiological and biochemical changes of embryo abortion in hybrids of seedless grapes and Chinese wild grapes. Acta Horticulturae Sinica, 2004, 31 (5): 651~653 (in Chinese)
- 王 晶, 罗国光. 巨峰葡萄胚和胚乳的发育. 园艺学报, 1996, 23 (2): 191~193
Wang J, Luo G G. The embryo and endosperm development in 'Kyoho' grapevines. Acta Horticulturae Sinica, 1996, 23 (2): 191~193 (in Chinese)
- 陈香波, 曹孜义. 离体葡萄未成熟胚成苗途径研究. 果树科学, 2000, 17 (4): 261~264
Chen X B, Cao Z Y. Studied on the ways for culturing immature embryos of grapevine. Journal of Fruit Science, 2000, 17 (4): 261~264 (in Chinese)
- 张宏明, 孟新法, 张路生. 激素对胚珠离体培养的影响. 北京农业大学学报, 1990, 16 (3): 227~282
Zhang H M, Meng X F, Zhang L S. The effect of plant growth regulators on ovule culture. Acta Agriculturae Universitatis Pekinensis, 1990, 16 (3): 227~282 (in Chinese)