

三倍体葡萄种质创新及倍性快速鉴定

赵艳华, 程和禾, 吴雅琴*, 吴永杰, 李玉生

(河北省农林科学院昌黎果树研究所, 河北昌黎 066600)

摘要: 以二倍体葡萄品种玫瑰香、红地球、摩尔多瓦、无核奥迪亚及四倍体葡萄品种巨峰为亲本进行杂交授粉, 对杂种进行胚培养, 成株率最高可达 30.6%。对杂种后代用流式细胞仪初选, 确定 30 个杂交后代为三倍体植株。组合不同, 获得三倍体植株的比例不同, 目前获得的 225 个胚培养的葡萄杂种后代全部栽入大田。

关键词: 葡萄; 胚培养; 三倍体; 倍性鉴定

中图分类号: S 663.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 06-1161-06

Germplasm Development of Triploid Grapevine and Rapid Identification of Chromosomes Ploidy

ZHAO Yan-hua, CHENG He-he, WU Ya-qin*, WU Yong-jie, and LI Yu-sheng

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

Abstract: Diploid grape ‘Muscat Hamburg’, ‘Red Globe’, ‘Moldova’ and ‘Otilia seedless’ were crossed with tetraploid parents ‘Kyoho’. The hybrid embryos were *in vitro* cultured and regenerated into plantlets. The regeneration rate of plantlets reaches to 30.6%. By using Flow Cytometry, thirty triploid cross progenies were obtained. The results showed that the percentages of triploid cross progenies was different when with the different cross combinations of parents. Recently 225 regenerated grape progenies were transplanted into field.

Key words: grape; embryo culture; triploid grape breeding; identification of chromosome

大粒无核是目前葡萄育种的主要目标之一。二倍体与四倍体葡萄杂交是获得三倍体无核葡萄最有效的方法, 但是二倍体和四倍体杂交的最大障碍是亲和力差, 坐果率低, 杂种胚早期败育或胚乳解体, 获得的三倍体杂交种子生活力低, 很难得到杂交后代, 必须运用胚培养技术才能获得较多的杂交后代, 并在其中筛选三倍体杂种(郭印山等, 2005)。

徐海英等(2005)研究了葡萄二倍体与四倍体品种间杂交胚培养取样时期的确定, 同时也证明胚培养是获得三倍体的有效途径。

赵胜建等(1998)以葡萄‘郑州早红’(2x)与‘巨峰’(4x)杂交, 选育出极早熟、大粒、无核的三倍体无核品种‘无核早红’。

李世诚等(1998)利用无核与有核葡萄杂交, 对 6 个组合的胚珠进行培养, 获得了三倍体植株, 但是花而不稔。

收稿日期: 2010-10-19; 修回日期: 2011-05-18

基金项目: 河北省农林科学院项目(A09020203)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yaqin_wu@163.com)

本研究中借鉴前人的经验,并结合自己的研究基础,以二倍体无核葡萄品种、二倍体有核葡萄品种及四倍体葡萄品种为亲本杂交,并对获得的杂种后代进行胚培养,以提高后代的成苗率;利用流式细胞仪对杂种苗进行早期倍性鉴定,以期获得优良的三倍体葡萄新品种,并为相关研究提供种质材料。

1 材料与方法

1.1 杂交授粉

试验于 2003—2008 年在河北省农林科学院昌黎果树研究所资源圃及昌黎县五里营乡葡萄园进行。选用的试材为二倍体有核品种玫瑰香、红地球、摩尔多瓦,二倍体无核品种奥迪亚及四倍体有核品种巨峰。

于开花前 1 ~ 2 d 对母本去雄;父本花粉的采集在初花期进行,取出花药于干燥处晾干,花粉散出后收集于干净的小瓶中,储存在干燥器中,放入 5 °C 低温冰箱。

在母本品种开始开花、柱头上出现粘液时用气门芯授粉(赵胜建 等, 1998)。

杂交组合为:巨峰 × 玫瑰香、玫瑰香 × 巨峰、巨峰 × 红地球、摩尔多瓦 × 巨峰、摩尔多瓦 × 红地球、摩尔多瓦 × 玫瑰香、无核奥迪亚 × 巨峰。

1.2 胚培养

授粉后果实着色期取杂交果流水冲净后先在 75% 酒精溶液中浸泡 30 min,然后用 0.1% 的升汞消毒 10 min,再用无菌水洗 3 ~ 4 次后取出种子,切喙后在无菌水中浸泡 24 h,胚浮在水面的直接接种,未浮出的用镊子挤出胚接种,在培养基不变的情况下,胚萌发、生根、生长一次完成。培养条件:培养室温度 (25 ± 2) °C,光强 2 000 ~ 3 000 lx,每天照光 16 h。培养基为 B5 + IAA 0.2 mg · L⁻¹ + 活性炭 0.1 % + 蔗糖 30 g · L⁻¹ + 琼脂 6 g · L⁻¹, pH 5.8 (赵艳华 等, 2005)。

培养基的筛选:上述培养基在一些组合获得的成株率不是很理想,因此,此项研究中进一步作了培养基的筛选试验。采用了 3 种基本培养基:SH、NN69 和改良 B5,每一种基本培养基都添加 IAA 0.4 mg · L⁻¹。

败育率 (%) = 败育的胚/调查的总胚数 × 100。

成株率 (%) = 成株的胚数/接种的总胚数 × 100。

1.3 炼苗及移栽

试管苗继代 40 d 后移入日光温室驯化至茎部红褐色,开瓶锻炼 3 d,栽入营养钵(土:蛭石 = 1:1),浇透水(700 倍多菌灵)后用塑料膜覆盖保湿,4 d 后逐渐通风至全部揭掉薄膜。

1.4 杂种倍性鉴定

用流式细胞仪进行细胞倍性鉴定(吴雅琴 等, 2006)。所用机型为美国 B-C (Beckman-Coulter) 公司生产的 Epics Altra 流式细胞仪,光源为 15 mW 488 nm 氩离子激光。经激光激发,染色的 DNA 分子促发荧光,测定装置测定单个细胞核的 DNA 含量。测定结果由仪器直接绘出 DNA 曲线图。根据测定结果初步确定杂种后代的倍性。

2 结果与分析

2.1 胚发育及败育情况调查

调查结果（表 1）表明：四倍体 × 二倍体组合败育率最高，巨峰 × 玫瑰香和巨峰 × 红地球两个组合败育率分别为 85.97%和 80.17%；其次为二倍体 × 四倍体组合，玫瑰香 × 巨峰和摩尔多瓦 × 巨峰，败育率分别为 54.13%和 20.94%；二倍体 × 二倍体组合败育率最低，摩尔多瓦 × 玫瑰香，摩尔多瓦 × 红地球，仅为 2.98%与 2.20%。由此可知，不同的杂交组合及同一组合正反交的杂种后代败育率不同，为获得更多的杂交后代应重点考虑亲本的选配。

表 1 不同组合授粉后胚败育调查
Table 1 Embryo abortion of different parent combinations after pollination

组合 Cross	授粉数 Number of pollinated	获得胚珠数 Number of ovules	败育数 Number of aborted	正常发育数 Number of normal	败育率/% Abort rate
巨峰（4x）× 玫瑰香（2x） Kyoho × Muscat Hamburg	39	777	668	109	85.97
巨峰（4x）× 红地球（2x） Kyoho × Red Globe	45	1 034	829	205	80.17
玫瑰香（2x）× 巨峰（4x） Muscat Hamburg × Kyoho	5	573	310	263	54.13
摩尔多瓦（2x）× 巨峰（4x） Moldova × Kyoho	8	721	151	570	20.94
摩尔多瓦（2x）× 玫瑰香（2x） Moldova × Muscat Hamburg	4	436	13	423	2.98
摩尔多瓦（2x）× 红地球（2x） Moldova × Red Globe	5	501	11	490	2.20

2.2 基本培养基种类对胚培养的影响

以玫瑰香 × 巨峰的杂种胚为试材对改良 B5、NN69 和 SH 基本培养基进行比较，发现基本培养基成分对植株形成率影响显著。在添加相同浓度的生长调节物质的条件下（IAA 0.4 mg · L⁻¹），SH 培养基效果最差，成株率仅为 2.5%；NN69 略高，为 4.9%；改良 B5 效果最好，成株率达到 30.6%（表 2）。

表 2 基本培养基对玫瑰香 × 巨峰的杂种胚培养的影响
Table 2 Effects of basic media on embryo culture of hybrids come from Muscat Hamburg × Kyoho

基本培养基 Basic media	接种数 Noumber of inoculation	成株数 Number of Plantlets	成株率/% Plantlets formation rate	田间成株数 Noumber of plants in field	田间成株率/% Plants formation rate in field
NN69	183	9	4.9	9	100
改良 B5 Modified B5	91	51	30.6	49	96.1
SH	80	2	2.5	2	100

2.3 不同杂交组合的杂交胚培养

将不同杂交组合的胚接种在改良 B5 添加 IAA 0.4 mg · L⁻¹ 的培养基中，均可获得生长正常的杂种后代（图版，1）。

由表 3 可以看出, 胚培养后的成株率以二倍体 × 二倍体组合成株率最高, 摩尔多瓦 × 玫瑰香和摩尔多瓦 × 红地球成株率分别为 19.64% 与 18.75%; 其次为二倍体 × 四倍体组合, 玫瑰香 × 巨峰和摩尔多瓦 × 巨峰成株率分别为 17.79% 和 5.83%; 四倍体 × 二倍体组合成株率最低, 巨峰 × 玫瑰香和巨峰 × 红地球的仅 2.78% 与 4.49%。不同的杂交组合及同一组合的正反交的杂种后代成株率存在较大差异, 与前面的结果相似的是败育率低的组合成株率也高, 因此认为杂交胚的发育和生长与母本直接相关, 选用二倍体材料作母本, 易于获得大量的杂交后代。

表 3 不同杂交组合的杂交胚培养
Table 3 The embryo culture of hybrids with different crosses

杂交组合 Cross	接种数 Number of inoculated	获胚数 Number of embryos	胚发育率% Development rate	成株数 Number of plantlets	成株率/% Plantlets formation rate	田间成株数 Number of plants in field	田间成株率/% Plants formation rate
巨峰(4x) × 玫瑰香(2x) Kyoho × Muscat Amburg	108	69	63.89	3	2.78	3	100.0
巨峰(4x) × 红地球(2x) Kyoho × Red Globe	182	89	48.90	4	4.49	4	100.0
玫瑰香(2x) × 巨峰(4x) Muscat Hamburg × yoho	632	506	80.10	90	17.79	70	77.8
摩尔多瓦(2x) × 巨峰(4x) Moldova × Kyoho	520	103	19.81	6	5.83	5	83.3
摩尔多瓦(2x) × 玫瑰香(2x) Moldova × Muscat Hamburg	275	183	66.55	54	19.64	46	85.2
摩尔多瓦(2x) × 红地球(2x) Moldova × Red Globe	490	240	48.98	45	18.75	37	82.2

2.4 杂交后代的倍性鉴定

2.4.1 二倍体与二倍体杂交后代

二倍体与二倍体间杂交的杂交苗的倍性与父本和母本的倍性没有差别, 仍为二倍体。

2.4.2 二倍体与四倍体杂交后代

以二倍体玫瑰香为对照, 利用流式细胞仪对 2004—2008 年获得的 225 个胚抢救的葡萄杂交后代进行了倍性分析, 共有 156 个 2x、30 个 3x、39 个 4x。

表 4 杂交后代染色体倍性检测
Table 4 The chromosomes ploidy identification of hybrids

杂交组合 Cross	检测株系数 Number of clones	三倍体数 Number of triploid	二倍体数 Number of diploid	四倍体数 Number of tetraploid
巨峰(4x) × 玫瑰香(2x) Kyoho × Muscat Hamburg	9	5	1	3
巨峰(4x) × 红地球(2x) Kyoho × Red Globe	58	21	2	35
玫瑰香(2x) × 巨峰(4x) Muscat Hamburg × Kyoho	151	4	147	0
摩尔多瓦(2x) × 巨峰(4x) Moldova × Kyoho	4	0	3	1
无核奥迪亚(2x) × 巨峰(4x) Otilia seedless × Kyoho	3	0	3	0

巨峰 × 玫瑰香共获得 9 个杂交后代，经检测有 5 株三倍体后代，三倍体比例为 55.6%。巨峰 × 红地球杂交后代 58 个，其中有 21 株三倍体后代，三倍体比例为 36.2%；玫瑰香 × 巨峰杂交后代共 151 个，有 4 株三倍体后代产生，三倍体比例为 2.7%；摩尔多瓦 × 巨峰杂交后代没有三倍体后代产生，为验证建立的胚抢救技术的实用性，在无核奥迪亚 × 巨峰杂交组合中应用，虽然得到了 3 个杂交后代，但也未获得三倍体（表 4）。由于试验的数量较少，上述结果还需进一步验证。由此看出，四倍体巨峰作母本的杂交组合获得的三倍体后代比例最高。

2.5 杂种苗与结果性状观察

试管苗继代 40 d 后移入日光温室，移栽成活率达 90% 以上（图版，2），大田移栽成活率 95% 以上。

将获得的 225 个胚抢救的葡萄杂种后代全部栽入大田，并观察结果状况，2010 年共有 50 个株系结果，其中 3 个株系的果实为无核个体（图版，3 为其中 1 株结果的照片），与流式细胞仪的倍性分析结果一致。为验证倍性的准确性下一步还需做染色体数镜检。



图版说明：

1. 巨峰 × 玫瑰香杂交种子胚培养；2. 杂交苗移栽；3. 巨峰 × 玫瑰香的三倍体杂交后代的果实。

Explanation of plates:

1. The embryo culture of Kyoho × Muscat Hamburg; 2. Planting of grape hybrids; 3. The fruits of triploid plant of Kyoho × Muscat Hamburg.

3 讨论

以往的报道中，取胚的方法均是切喙或剥离（Okamoto et al., 1993；李世诚 等，1998）。本试验中通过观察发现切喙后在无菌水中浸泡 24 h，胚很容易从壳内脱离出来浮在水面，既可节省时间，也降低了用镊子挤压造成的损失和伤害。

迄今为止，胚培养采用的基本培养基种类较多，如 Tukey、S.B.H、White、MS、Nitsch、Miler 以及各种改良配方，另外对盐浓度、糖浓度以及激素如何协调及添加等的研究颇多，说法也各异。作者通过多年摸索得到了具有广泛适应性的培养基（改良 B5 + IAA 0.4 mg · L⁻¹），此培养基应用于 7 个葡萄杂交组合的杂种培养均获得了较好的效果，可实现胚萌发培养、生根及生长一次完成，建立的胚培养方法简单、高效，在较短时间内获得了大量的三倍体材料。目前这批杂交后代已定植大田，并陆续结果。但其性状能否稳定保持有待后期农艺性状观察。

闫爱玲等（2008）认为利用试管苗嫩叶进行细胞学鉴定用时最短，是一种有效方法。作者根据杂种苗鉴定工作的需要，对利用流式细胞计数法鉴定葡萄倍性的方法作了改进，使田间试材也可利用。

References

- Guo Yin-shan, Guo Xiu-wu, Zhang Hai-e, Li Yi-hui, Li Cheng-xiang. 2005. Studies on acquiring triploid grape with embryo rescue techniques. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 36 (5): 606 - 608. (in Chinese)
- 郭印山, 郭修武, 张海娥, 李轶晖, 李成祥. 2005. 利用胚挽救技术获得三倍体葡萄植株研究. *沈阳农业大学学报*, 36 (5): 606 - 608.
- Li Shi-cheng, Jin Pei-feng, Jiang Ai-li. 1998. Ovule culture to obtain triploid progeny from crosses between seedless cultivars and tetraploid grapes. *Acta Agraculturae Shanghai*, 14 (4): 13 - 17. (in Chinese)
- 李世诚, 金佩芳, 蒋爱丽. 1998. 与四倍体葡萄杂交的无核葡萄胚珠培养获得三倍体植株. *上海农业学报*, 14 (4): 13 - 17.
- Okamoto G, Hirano K, Tanakamaru N, Omori N. 1993. Obtaining triploid muscat grapes by *in vitro* culture of ovules and embryos after crossing between diploid and tetraploid cultivars. *Scientific Reports of the Faculty of Agriculture, Okayama University*, 82: 25 - 29.
- Wu Ya-qin, Zhao Yan-hua, Cheng He-he, Zhao Sheng-jian, Guo Zi-juan, Ma Ai-hong. 2006. Study on ploidy of grapevine by Flow Cytometry // Li Xian-li, Wang Xiu-feng. *Advance in Horticulture (VII)*. Beijing: China Agriculture Press: 182 - 185. (in Chinese)
- 吴雅琴, 赵艳华, 程和禾, 赵胜建, 郭紫娟, 马爱红. 2006. 流式细胞术检测葡萄倍性的研究 // 李宪利, 王秀峰. *园艺学进展* (第 7 辑). 北京: 中国农业出版社: 182 - 185.
- Xu Hai-ying, Yan Ai-ling, Zhang Guo-jun. 2005. Determination of the proper sampling period for embryo rescue from crosses between diploid and tetraploid grape cultivars. *Scientia Agricultura Sinica*, 38 (3): 629 - 633. (in Chinese)
- 徐海英, 闫爱玲, 张国军. 2005. 葡萄二倍体与四倍体品种间杂交胚挽救取样时期的确定. *中国农业科学*, 38 (3): 629 - 633.
- Yan Ai-ling, Zhang Guo-jun, Xu Hai-ying. 2008. Embryo rescue and identification of hybrids between diploid grape and tetraploid grape. *Acta Agriculturae Boreai-occidentalis Sinica*, 17 (3): 223 - 226. (in Chinese)
- 闫爱玲, 张国军, 徐海英. 2008. 葡萄不同倍性品种间杂交胚挽救及鉴定. *西北农业学报*, 17 (3): 223 - 226.
- Zhao Sheng-jian, Zhao Shu-yun, Guo Zi-juan. 1998. The breeding and cultivation of new triploid grape variety 'Seedless Zaohong'. *Hebei Fruits*, (3): 30 - 31. (in Chinese)
- 赵胜建, 赵淑云, 郭紫娟. 1998. 三倍体新品种无核早红及配套栽培技术. *河北果树*, (3): 30 - 31.
- Zhao Yan-hua, Wu Ya-qin, Zhao Sheng-jian, Guo Zi-juan, Cheng He-he. 2005. Study on The embryo rescue of the crossed between diploid and tetraploid grape. *Acta Agriculturae Boreali-sinica*, 20 (6): 110. (in Chinese)
- 赵艳华, 吴雅琴, 赵胜建, 郭紫娟, 程和禾. 2005. 二倍体与四倍体葡萄品种间杂交胚抢救研究, *华北农学报*, 20 (6): 110.

征 订

《蔬菜学》

本书由方智远院士主编, 江苏科学技术出版社出版发行。全书共分7大章, 33个小节, 44万字, 552页, 本书较系统地记叙了中国蔬菜学发展的历史轨迹、学术成就; 比较全面地论述了蔬菜作物种质资源、遗传育种、栽培技术、病虫害防治以及贮藏加工等各个专业的性质、研究内容; 简述了21世纪中国蔬菜学的发展趋势。本书兼理论性与实践性、政策性与操作性于一体, 有利于读者更加深入地了解蔬菜学, 研究蔬菜学, 是从事蔬菜科研、教学及生产实践有关人员的良好参考书籍。定价: 47元 (含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。