北方园艺 2008(7):28~30

葡萄不同倍性品种的杂种胚挽救及鉴定

闫爱玲,张国军,徐海英

(北京市农林科学院林业果树研究所,北京 100093)

摘 要:以二倍体葡萄为母本,与四倍体葡萄杂交,杂种进行胚珠培养,获得三倍体植株。胚珠培养胚萌发率最高可达 39.21%,成苗率最高可达 35.32%。先用细胞倍性测定仪初选,再用卡宝品红染色法根尖计数染色体为 57 条。不同组合取样时期可确定为:早熟母本为花后 40~50 d 内,中熟品种为 50~60 d,晚熟品种则为 60~80 d。

关键词:葡萄育种;胚挽救;三倍体

中图分类号:S 663.103.3 文献标识码:A 文章编号:1001—0009(2008)07—0028—03

无核葡萄的培育是现在葡萄育种工作的主要课题之一。通常无核葡萄的育种采用杂交的方法。但由于无核葡萄品种之间杂交时合子胚未发育成熟就中途败育,无法得到杂交后代,给育种工作带来很大困难。一般育种者用有籽母本与无籽父本杂交来得到杂交后代,但存在的主要问题是需要时间长,无籽后代频率低和预选困难等。多倍体育种是获得大粒无核葡萄的方法之一。而二倍体品种与四倍体品种之间杂交所得的三倍体后代多数是无核的[1]。且多倍体一般具有生长旺盛、果实大、产量高、适应性和抗逆性强等特点[2]而被育种者看好。但在杂交后代中表现出杂交胚珠成熟时大量败育,很难获得杂种后代。该试验通过杂交胚的挽救培养,获得了杂种,,并对杂种胚培苗进行了早期鉴定,现已将一批杂种胚培苗定植于大田,为进一步育种和有关研究提供了种质材料。

1 材料和方法

1.1 杂交授粉

试验于 1999~2003 年在北京市农林科学院林业果树研究所内进行。开花前 2~3 d 对母本去雄;父本的花粉采集在初花期进行,取出花药于干燥处晾干,花粉散出后收集于干净的小瓶中,储存于干燥器中。在母本品种开始开花至终花、柱头上出现粘液时分 2~3 次授粉(用毛笔挑花粉散点于带粘液的柱头上),每一组合授粉 20~25 穗。所用的杂交组合为:紫珍香×玫瑰露、早玛瑙×峰后、玫瑰香×京优、秋红×峰后。

1.2 胚培养

授粉后 45~80 d 取杂交果实,流水冲净先在 0.1% 的新洁尔灭(5%)溶液中浸泡 30 min,然后用 0.1% 的升汞消毒 6~8 min,再用无菌水洗 3~4 次。在无菌条件下取胚珠进行离体培养。先在发育培养基上使胚珠继续发育,40 d 左右以后,放入萌发培养基中使其萌发,萌发后再转移至生长培养基中培养成苗。培养室温度(25±2)℃,2 000~3 000 lx 照度每天照光 16 h。培养基中均添加琼脂 5 g/L,pH 值调至 5.8。

发育培养基的筛选:采用了 3 种基本培养基为 MS、NN 和 B_5,每一种基本培养基都采用 2 种激素配比 I 和 II。培养基附加 0.1% 的活性炭和 30 g/L 的蔗糖。

发芽培养基的筛选:以 1/2 MS、MS 为基本培养基,以 BA、NAA 2 种激素不同浓度组合设计 7 种培养基进行筛选。培养基附加 0.1% 的活性炭和 20 g/L 的蔗糖。

练苗及移栽:为了提高杂种苗的移栽成活率,对杂种苗进行了杂种苗根系长度与须根条数、揭瓶盖温室练苗与不揭瓶盖温室练苗、蛭石消毒与不消毒、或不经蛭石直接移入装营养土的营养钵内等试验比较与筛选。

1.3 杂种鉴定

先用倍性分析仪进行倍性鉴定:将 10 mg 新生幼嫩叶片在 0.5 mL 的 Pratec HR-A 溶液中研磨。将样品通过 30 μmol Pratec Celltrics 微孔膜过滤到测试管中,加入 0.5 mL 的 Pratec HR-B 溶液于样品中,将样品上样于德国 Pratec 公司的倍性分析仪,用流式细胞计数法测定葡萄叶片单个细胞核的 DNA 含量。测定结果由仪器直接绘出 DNA 曲线图。根据测定结果,初步确定杂种单株的倍性。然后将分析过倍性有变化的单株采用卡宝品红染色法进一步确定染色体数目。

2 结果与分析

2.1 不同杂交组合的胚珠取样时期的确定

从表 1 中可以看出,在花后 35 d 以前,早熟品种胚珠发芽率很低、成苗率就更低了,多数发芽胚珠的取样

第一作者简介:闫爱玲(1972-)女,新疆阿克苏人,硕士,现主要从事葡萄育种与栽培研究。E-mail:lgsyal@sina.com。

通讯作者:徐海英。

基金项目:国家“863”资助项目(2001AA241143)。

收稿日期:2008—02—24

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

时期集中于花后 45～60 d,且相对成苗率也高。中熟品种在 45 d 以前,胚珠发芽率、成苗率都不高,晚熟品种则又较中熟品种晚 10 d 左右,这说明胚珠在活体内发育到一定程度之前,胚的发育不够完全,胚挽救的难度较大,就是发芽了,芽生长也不太正常,畸形苗也较多。其中早熟品种在花后 45 d 胚发育的比较好,适宜取样;中熟品种则在花后 55 d 后取样;晚熟品种在 65 d 后取样比较合适。

表 1 不同组合取样时间对胚发芽成苗影响

杂交组合	培养日期/d	胚发芽率/%	成苗率/%
紫珍香×玫瑰露	35	6.27	2.32
	45	16.45	14.51
	60	10.33	8.62
早玛瑙×峰后	35	4.35	1.78
	45	15.4	13.12
	60	14.23	12.93
玫瑰香×京优	45	8.56	4.24
	55	25.00	22.14
	70	26.34	24.57
秋红×峰后	55	6.35	1.45
	65	26.12	15.62
	80	39.21	35.32

2.2 不同的发育培养基对“玫瑰香×京优”杂交胚发育的影响

表 2 所示为 3 类 6 种发育培养基培养胚珠的最终发芽率。2 种激素配比对胚珠的发育影响不大,而基本培养基类型对胚珠发育有决定性的影响。在 MS 培养基上都得到了平均 20%以上的发芽胚珠,其次为 B_5 培养基(平均 11.4%)。

表 2 不同发育培养基上胚培发芽率比较

培养基编号	基本培养基	发芽率/%
M1	MSⅠ	20.59
M2	MSⅡ	20.00
N1	NitschⅠ	1.03
N2	NitschⅡ	0.00
B1	B_5Ⅰ	14.55
B2	B_5Ⅱ	8.16

2.3 不同的发芽培养基对“玫瑰香×京优”杂交胚发育的影响

试验中试用了 7 种发芽培养基如表 3。就基本培养基而言,在激素配比浓度相同的情况下,1/2 MS 培养基与 MS 培养基没有明显差异,发芽率分别为 2.92%(3)和 3.15%(4)。在所有含 BA 的培养基中胚的发芽率都较低(1、2、3、4),最高 5.73%(1),最低不足 3%(3)。说明培养基中加入 BA 不利于胚的萌发。1/2 MS 培养基中单加低浓度的 NAA(6),萌发率提高到 26.96%,MS 培养基不加任何激素(7)萌发率最高,达到 35%以上。这说明若胚在发育培养基中发育完整后,既使不使用激素,也能正常发芽成苗,这正与李世诚[3]等在无核葡萄与四倍体杂交胚发育培养完成后,转到无激素的培养基中发芽成苗试验结果一致(见图 1,2)。

表 3 不同发芽培养基上胚培发芽率比较

培养基编号	基本培养基	BA/mg·L^{-1}	NAA/mg·L^{-1}	发芽率/%
1	1/2 MS	1		5.73
2	1/2 MS	2		4.13
3	1/2 MS	1	0.1	2.92
4	MS	1	0.1	3.15
5	1/2 MS			15.42
6	1/2 MS		0.02	26.96
7	MS			35.14

2.4 杂种苗的移栽试验

通过试验筛选得出:当苗的根系长至 3～5 cm 长,根系呈白色、根尖呈米黄色;苗高 8～10 cm,生长健壮时将试管苗不揭盖放入温室 3 d 后再揭盖,经 1 周练苗,移入消毒过的蛭石中,保温、保湿 1 个月后,待新根新叶长出后再移至沙∶草炭∶土＝1∶1∶2 的花盆中。待气候适宜时再移入露地,这样的过程能提高移栽成活率最终能达 70%以上。其中,苗在蛭石中每隔 10 d 浇 1 次含大量元素的营养液;在蛭石中时应在温室中再搭一塑料小拱棚,以保证小苗的生长空间内空气湿度达 80%。而且移栽苗一定要生长健壮、叶片深绿,这一点很重要。这与潘学军[4]等试验结果都是一致的。移栽苗生长见图 3。

2.5 杂种鉴定

2.5.1 倍性分析仪鉴定 先用杂种苗的父母本作标准,调出二倍体的标准曲线,峰值为 50,四倍体的峰值为 100 以此为基础,再测杂种小苗叶片 DNA 含量,得到峰值图(见图 5)再根据此图制 DNA 峰值曲线(图 6)。若峰出现在 75 左右,则初步确定该杂种为三倍体。

2.5.2 染色体数目观察 对经过倍性分析仪检测为三倍体的植株进一步用卡宝品红染色法测定根尖或茎尖染色体数目,染色体数目为 57(见图 4),确定为三倍体。

杂种鉴定工作可以当杂种还在试管内时就进行。只要该杂种有幼嫩的叶片,就可以用倍性分析仪测定体细胞倍性;根尖染色体数目观察,要选取 3～5 cm 长根的尖部 0.5 cm 处米黄色部分。因此可实现杂种的早期鉴定、筛选,而无需在田间或结果后进行。

3 讨论

对于不同组合的取样时期的确定:早熟品种在花后 35 d 以前、中熟品种在 45 d 以前、晚熟品种在50 d 以前因胚发育不完全而挽救比较困难;但是在过去的试验中[5]观察,早熟品种从花后第 5 周就开始有败育胚珠出现,中熟品种开始败育时期比早熟品种晚 1 周,晚熟品种在花后 9 周才开始有较小比率的胚珠开始败育。这对取样时间就有了更高的要求:既要取得较高的胚挽救成苗率,又要保证胚在树体上还未败育就取样。综合以上 2 点要求,确定了不同成熟期胚挽救的取样时期:可以根据母本品种成熟期来确定,早熟品种集中在为授粉

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

后40～50 d进行，中熟品种则在授粉后50～60 d内进行，对于晚熟品种则比较宽松些，为授粉后60～80 d进行都可以。对于不同品种的培养基的选择，还需做进一步的工作，以取得更好的胚挽救成苗率。

对于杂种苗的鉴定工作，赵胜建[6]综述了可以通过植物性状、器官组织、细胞学鉴定等几种方法，在试验中得出：对于不同品种间通过胚挽救的杂种苗，其中细胞学鉴定相对用时最短、最早进行。它是能在胚培苗还未经过移栽就能进行的一种有效方法。流式细胞计数仪也即倍性鉴定仪可从试管中取幼嫩叶片测定DNA含量，初步筛选出三倍体单株。而该仪器测定样品步骤简单、速度快，几分钟就可出结果，是个很可取的方法。而后的复选，也即根尖染色体数目检测，用卡宝品红滴染根尖后显微镜观察也是个较有效的方法。只是在此步骤中，样品的选取很重要，一定得生长旺盛的幼嫩根尖。

参考文献

[1] 赵胜建，郭紫娟．三倍体无核葡萄育种研究进展[J]．园艺学报，2004，21(4)：360-364.

[2] 陈俊，李登科．葡萄多倍体化学诱发育种方法[J]．葡萄栽培与酿酒，1997(2)：26-27.

[3] 李世诚，金佩芳，蒋爱丽，等．与四倍体葡萄杂交的无核葡萄胚珠培养获得三倍体植株[J]．上海农业学报，1998，14(4)：13-17.

[4] 潘学军，王跃进，张剑侠，等．葡萄胚挽救苗移栽技术的研究[J]．西北植物学报，2004，24(6)：1077-1082.

[5] 徐海英，闫爱玲，张国军．葡萄二倍体与四倍体品种间杂交胚挽救取样时期的确定[J]．中国农业科学，2005，38(3)：629-633.

[6] 赵胜建．三倍体葡萄胚培养、倍性鉴定及育种进展[J]．河北农业科学，2004，8(4)：90-93.

附图：

图1

图2

图3

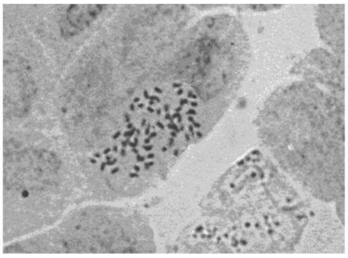

图4

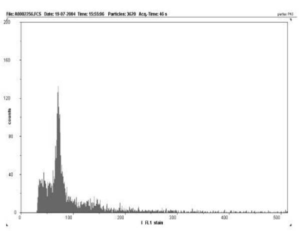

图5

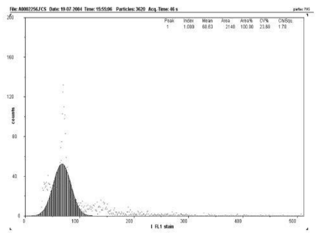

图6

图版说明：1.杂种胚的萌发；2.杂种苗的生长情况；3.温室营养土中生长情况；4.紫珍香×玫瑰露杂种苗的根尖染色体数目57(显微镜下400倍拍摄)；5.紫珍香×玫瑰露杂种叶片检测显示DNA含量峰值图；6.计算机根据检测绘制DNA峰值曲线。

Embryo Rescue and Identification of Hybrids Between Diploid Grape and Tetraploid Grape

YAN Ai-ling，ZHANG Guo-jun，XU Hai-ying

(Forestry and pomology Institute，Beijing Academy of Agri-foresty Sciences，Beijing 100093，China)

Abstract: Diploid grape "Zizhengxiang"、"Muscat Hamburg" et al were crossed with tetraploid pollen parents "Delaware"、"Fenghou" et al. and the hybrid triploid plants were obtained by means of in vitro ovule culture. The highest rates of surviving embryos and regenerated plantlets were 39.21% and 35.32%, respectively. Root tip cells of plantlets diploid tetraploid grapes had 57 chromosomes. The best ovule sampling time focused on 40～80 days after pollination according to female parents' different fruit ripe time.

Key words: Grape Breeding；Embryo rescue；Triploid

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net