

紫香无核胚培养技术研究

王 珊, 李 荣, 樊新民, 刘怀锋

(石河子大学 农学院, 新疆 石河子 832008)

摘 要:以紫香无核为母本, 黎明无核、克瑞森无核、京早晶分别为父本杂交, 对杂交胚珠进行培养挽救。结果表明: 在授粉后 52 d 接种, 3 个杂交组合的胚珠均达到最大发育率和最大萌发率; 胚珠发育阶段采用 ER 培养基培养的发育率比用 Nitsch 培养基的高, 但在 Nitsch 接种的萌发率却比 ER 的都高; 低温(7℃)处理的胚萌发率高于常温(24℃)培养的萌发率。

关键词:无核葡萄; 胚发育; 胚挽救

中图分类号:S 633.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)02-0148-03

葡萄是世界上最重要的果树种类之一^[1]。目前, 培育大粒、优质、无核葡萄品种是世界各国葡萄育种的重要目标^[2], 无核品种已成为栽培和贸易的主要种类, 无核性状是各个性状发展趋势的前提。在我国鲜食葡萄品种中, 有核品种占到 80% 以上, 而无核品种所占比例不足 20%。随着葡萄栽培面积的继续扩大, 对优质无核葡萄品种的需求更为迫切, 解决育种问题是关键。近年来, 自 Ramming 等^[3] 研究报道后, 胚挽救技术日益成为无核葡萄育种的最有效方式之一^[4], 极大地提高了优质、大粒无核葡萄新品种的选育效率。胚挽救技术采用无核葡萄品种间杂交, 在胚败育之前利用胚培养使幼胚继续发育, 提高了杂交后代群体无核单株的比例^[5], 缩短育种年限, 加快无核葡萄育种进程。目前, 对胚挽救技术的研究主要集中在栽培范围较广的无核品种胚挽救技术的影响因素上, 包括: 胚珠接种时期、基本培养基类型、生长调节剂组合和浓度、胚珠处理方式等^[6], 而对紫香无核这一新的无核品种胚培养的研究尚未见报道。该试验主要对紫香无核葡萄胚培养的适接种时期、基本培养基类型以及培养温度进行了研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2008 在石河子大学农学院实验站进行, 母本为 3 a 生紫香无核葡萄, 分别与黎明无核、克瑞森无核和京早晶进行杂交。紫香无核, 又名新葡四号, 由新疆石河子葡萄研究所育成, 2004 年通过新疆农作物品种审定委员

会审定命名。

1.2 试验方法

1.2.1 杂交 在初花期采集杂交父本的花粉, 晾干备用。在母本即将开花时去雄, 去雄后套袋, 待柱头出现分泌液后分别用 3 个父本的花粉进行授粉, 授粉后立即套上纸袋。

1.2.2 胚发育培养 胚培养时间: 于授粉后 30 d 开始每隔 7 d 取杂交的果粒, 带回试验室进行消毒处理, 流水中浸泡 20~30 min, 然后于超净工作台上用 75% 酒精漂洗 25~35 s 后, 立即用无菌水冲洗 3~4 次, 再将果粒放入 0.1% 升汞溶液中浸泡 8~10 min, 用无菌水冲洗 5 次, 每次各 3 min。将消毒后的果粒剖开, 将胚株接种到 ER 和 Nitsch 培养基上, 添加 6-BA 0.5 mg/L、蔗糖 60 g/L、琼脂 5 g/L、pH 5.8。培养温度为 24℃, 光照时间为 14 h。培养 60 d 后统计发育胚珠数, 发育的胚珠数以距胚珠合点约 1/3 处横切查看胚是否存在来确定。胚培养的基本培养基: 授粉后 52 d 采集的幼果, 按上述方法进行消毒处理后, 将胚珠分别接种在 ER 和 Nitsch 培养基上, 添加 6-BA 0.5 mg/L、蔗糖 60 g/L、琼脂 5 g/L、pH 5.8。培养 60 d 后统计胚发育的情况, 确定基本培养基对胚发育的影响。

1.2.3 温度对胚萌发培养 将发育的胚珠接种到 1/2 MS 培养基上, 添加 IAA 0.4 mg/L、6-BA 0.4 mg/L、蔗糖 35 g/L、活性炭 1.5 g/L、琼脂 5 g/L、pH 5.8。在培养到 100 d 左右时, 将一部分发育的胚珠转移到 7℃ 培养箱中培养 1 个月后, 再转到 24℃ 培养, 研究温度对胚萌发的影响。

2 结果与分析

2.1 不同接种时期对胚发育及萌发的影响

由表 1 可知, 紫香无核×克瑞森无核、紫香无核×黎明无核、紫香无核×京早晶都是在授粉后 52 d 接种时, 胚珠的发育率最高, 其中又以紫香无核×京早晶的

第一作者简介: 王珊(1985—), 女, 在读硕士, 现主要从事果树栽培生理研究。E-mail: yxzgxb@163.com。

通讯作者: 刘怀锋(1972—), 男, 博士, 副教授, 现主要从事果树栽培生理研究。E-mail: lhf_agr@shzu.edu.cn。

基金项目: 石河子大学动植物育种专项资助项目(gxjs2007-yz05)。

收稿日期: 2009-10-10

发育率最高。继续在同一萌发培养基上培养 60 d 后, 胚的萌发率达到最大值。由此可以确定, 紫香无核胚珠适

宜接种时期为花后 52 d 左右, 达到最大发育率和最大萌发率。

表 1 接种时期对紫香无核胚发育的影响

杂交组合	取样时期 (花后天数)/d	总胚珠数	发育胚珠		萌发胚珠	
			数量	比率/%	数量	比率/%
紫香无核×克瑞森无核	30	30	2	6.7	—	—
	38	34	10	29.4	—	—
	45	22	11	50.0	—	—
	52	30	14	46.7	3	21.4
紫香无核×黎明无核	30	35	12	34.3	—	—
	38	42	11	26.2	1	9.1
	45	49	34	69.4	3	8.8
	52	26	22	84.6	5	22.7
紫香无核×京早晶	30	33	7	21.2	1	14.3
	38	41	8	19.5	—	—
	45	33	13	39.4	2	15.4
	52	20	17	85.0	5	29.4

注:“—”表示萌发数、萌发率为 0。

2.2 不同培养基对胚发育及萌发的影响

由表 2 可知, 在培养 60 d 后, 紫香无核×黎明无核、紫香无核×京早晶的杂交胚珠在 ER 培养基上达到最大发育率, 说明 ER 培养基适合这 2 种杂交组合胚珠的发育培养。在培养过程中观察到接种到 ER 培养基的胚珠褐化率比接种到 Nitsch 的高。继续培养 100 d 后, 紫香无核×京早晶杂交胚珠在 Nitsch 和 ER 培养上的萌发率分别为 26.3%和 17.4%, 均高于紫香无核×黎明无核杂交胚珠的萌发率。

表 2 不同胚发育培养基对胚挽救的影响

培养基	杂交组合	总胚珠数	发育胚珠		萌发胚珠	
			数量	比率/%	数量	比率/%
Nitsch	紫香无核×黎明无核	40	29	72.5	7	24.1
	紫香无核×京早晶	35	19	54.3	5	26.3
ER	紫香无核×黎明无核	28	22	78.6	2	9.1
	紫香无核×京早晶	26	17	65.4	3	17.6

2.3 低温处理对胚萌发的影响

由表 3 得出, 对 3 个杂交组合 7℃低温处理的胚萌发率都高于 24℃常温培养的胚萌发率, 从表 3 中看出影响较大的是紫香无核×克瑞森无核, 而对紫香无核×黎明无核的作用较小。

表 3 低温处理对胚萌发的影响

温度/ ℃	杂交组合	发育胚珠	萌发胚珠	
			数量	比率/%
7	紫香无核×克瑞森无核	30	5	16.7
	紫香无核×黎明无核	32	8	25.0
	紫香无核×京早晶	32	4	12.5
24	紫香无核×克瑞森无核	30	3	10.0
	紫香无核×黎明无核	30	7	23.3
	紫香无核×京早晶	33	3	9.1

3 讨论

3.1 胚发育的标准

该试验胚珠的发育率是以胚珠上部约 1/3 处横切查看胚是否存在为标准的, 这是因为在最早的转接过程

中观察到胚珠虽然是绿色的但是剖开之后发现胚早已败育, 只剩下珠被及空的胚腔, 在之后的培养过程中单独拿出一部分接种的绿色胚珠做试验, 发现直到培养 6 个月, 胚珠依然是绿色的, 且没有变化, 这样得出的以胚珠绿色作为胚发育的标准^[7]是不科学, 这与郝燕^[1]得出的发育胚珠数和发育胚数有很大差距是一致的, 但是横切胚珠的办法无法得出横切对胚珠萌发的影响, 所以胚发育率的标准有待于研究。

3.2 接种时期对胚发育的影响

葡萄的胚发育过程经合子—多胞时期—球形胚—心形胚—鱼雷形胚—大子叶形胚^[8], 在不同的发育阶段取材, 胚发育萌发的程度不同, 由试验观察这与种子的外表不成比例, 最佳接种时期是在自然条件下胚发育达到最高程度而败育率达到最低时。由试验得出, 在授粉 52 d 后 3 个杂交组合胚发育萌发率达到最大, 这是最佳接种时期, 这与郭修武^[9]得出葡萄胚挽救最佳接种时期在花后 45~60 d 相一致。

3.3 培养基对胚发育的影响

对不同培养基对胚发育的影响研究表明, 在胚挽救中, 胚珠发育阶段采用 ER 培养基比 Nitsch 效果好, 这与唐冬梅^[10]得出的结论 ER 培养基对发育影响效果较好相一致。但是 ER 培养基的褐化率较高, 这可能是因为 ER 培养基中的无机盐浓度远高于 Nitsch 培养基^[11]。由表 2 得出, 在 Nitsch 接种的萌发率比 ER 的都高, 这说明胚珠发育率与萌发率并不成正比, 即发育的胚珠不一定萌发, 这可能是由于在发育之后的培养过程中其它因素, 比如激素水平不当导致胚坏死或者胚发育一段时间后由于多种未知的、自身的原因致使胚最终败育而未能萌发。

3.4 低温处理对胚发育的影响

低温处理促进胚发育萌发, 这与蒋爱丽^[12]的研究结

果相一致。但是影响的程度因为培养的不同品种,不同杂交组合而不同,有的与常温培养有明显的差异,有的不明显。该研究是在培养到 100 d 时对发育的胚珠进行 30 d 的 7℃低温处理的胚萌发率高于常温下的萌发率。石艳^[13]在接种前对果穗 30 d 的 5~8℃处理对胚挽救也获得了类似的结果。低温处理的时间及温度与对胚挽救的影响还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 郝燕. 无核葡萄胚挽救育种及新种质创新研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2007.
- [2] 仝桂梅. 无核葡萄杂种胚珠的培养及萌发成苗的若干影响因素[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2001(4): 24-27.
- [3] Ramming D W, Ledbetter C A, Tarilo R. Hybridization of seedless grape[J]. Vitis spec. Issue proc. 5th Intl Symp. Grape. Breeding, 1990, 439-444.
- [4] Kazumori Notsuka, Takekazu Tsuru, Mikio Shiraiishi. Seedless — seedless grape Hybridization via — ovule embryo culture[J]. J. Japan. Soc. hort. Sci. 2001, 70(1): 7-15.

- [5] 程琳琳, 王跃进, 石艳, 等. 无核葡萄胚挽救影响因素的研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(7): 1317-1322.
- [6] 马丽. 胚挽救在无核葡萄育种上的应用[J]. 北方果树, 2008(3): 3-6.
- [7] 赵密珍, 苏家乐, 钱亚明, 等. 红宝石无核葡萄胚珠培养成苗技术研究[J]. 果树学报, 2005, 22(3): 166-168.
- [8] 王飞. 葡萄无核品种及其杂种胚发育机理与胚挽救技术研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2002.
- [9] 郭修武, 郭印山, 张海娥, 等. 接种时期和培养基对无核葡萄胚挽救的影响[J]. 园艺学报, 2007, 34(2): 329-332.
- [10] 唐冬梅. 无核葡萄胚挽救育种技术研究及种质创建[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2005.
- [11] 侯义龙. 果树组织培养技术及其应用[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2007: 72-73.
- [12] 蒋爱丽, 李世成, 金佩芳, 等. 大败育型无核葡萄胚珠培养成苗技术研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2002, 20(1): 45-48.
- [13] 石艳. 胚挽救技术创制无核及多倍体葡萄新种质[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2008.

Study on Embryo Rescue of Zixiang Seedless Grape(*Vitis vinifera* L.)

WANG Shan, LI Rong, FAN Xing-min, LIU Huai-feng
(Agricultural College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003)

Abstract: Factors about embryo rescue of three hybridization crosses: Zixiang seedless Liming seedless, Zixiang seedless Crimson, Zixiang seedless Jingzaojing were studied. The results showed that the best embryo culture time for this three hybridization crosses was 52 days after Pollination. For the development of embryo, the best medium was ER, the germination rate of embryo in nitsch medium was higher than that of ER; Germination rate of embryos cultured at low temperature (7℃) was higher than that at normal temperature (24℃).

Key words: seedless grape; embryo development; embryo rescue

热烈祝贺

黑龙江省农业科学院编辑出版中心网站正式开通

黑龙江省农业科学院编辑出版中心下设《北方园艺》、《大豆科学》、《黑龙江农业科学》及《黑龙江农科院报》,是全国大专院校、科研单位、科技推广部门展示科研成果的重要窗口,是联系农业科研生产的桥梁。为了进一步加强编、读、审互动,为读者、作者及编辑搭建更完备、更先进、更畅通的交流互动平台,中心自 2010 年元月起正式开通黑龙江省农科院编辑出版中心网站,网址:www.haasep.cn。

网站拥有在线投稿、稿件查询、在线订阅、读者留言、过刊浏览等方便、快捷的稿件处理功能,欢迎各位作者通过该网站进行投稿(网站运行初期,各编辑部电子邮箱仍可正常使用);网站还设有专家答疑、农时日历等栏目,在线解答农业生产中的疑难问题,为农民朋友提供最新的农业资讯。

凡在本刊刊登广告的客户,均可在网站免费发布广告。同时,网站承接各类行业相关广告的发布。