

# 抗寒无核葡萄胚挽救影响因素的研究

赵 凯, 刘 巧, 张剑侠, 牛茹萱, 李桂荣, 王跃进

(西北农林科技大学 园艺学院, 农业部西北园艺植物种质资源利用重点开放实验室, 旱区作物逆境生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:**以 7 个种子败育型无核葡萄作母本, 2 个抗寒欧山杂种为父本进行杂交, 将杂交胚珠接种于培养基上进行胚挽救, 研究了不同培养基配方、不同种类氨基酸、亲本基因型对胚发育率和成苗率的影响。结果表明: 在 3 种胚珠培养的培养基中, 以 ER+水解络蛋白(CH)500 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L+IAA 1.5 mg/L 培养基获得了最高的胚发育率和成苗率, 但 CH 和 GA<sub>3</sub>+IAA 的添加对胚发育率及成苗率无显著影响; 添加不同种类氨基酸对‘波尔莱特’×‘北醇’组合胚的发育率及成苗率有不同影响, 以 1 mmol/L 丝氨酸的促进效果明显, 烟酸的添加对胚发育率和成苗率有一定的抑制作用。在以欧山杂种(‘玫瑰香’×‘黑龙江实生’)‘00-1-5’作父本的 6 个杂交组合中, 以‘京大晶’作母本获得了最高胚发育率和成苗率, 分别为 36.66% 和 4.16%; 在以欧山杂种‘北醇’作父本的 2 个杂交组合中, 分别以‘皇家秋天’和‘红无籽露’作母本, 胚的发育率和成苗率无差异; 以‘北醇’作父本比‘00-1-5’作父本胚的发育率和出苗率有所提高, 但结果不显著。通过该研究共获得了抗寒无核葡萄胚挽救新种质 39 个株系。

**关键词:**无核葡萄; 抗寒性; 种质; 胚挽救

**中图分类号:**S 663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)17-0011-05

无核葡萄育种是国内外葡萄育种的重要课题。无核葡萄分为单性结实和假单性结实 2 类, 假单性结实是指经过授粉受精, 但胚和胚乳发育一段时间后便停止, 从而导致种子败育, 最终只留下种痕, 无法获得具有萌发能力的种子<sup>[1]</sup>, 育种上主要是利用这一类型的无核葡萄。

**第一作者简介:**赵凯(1986-), 男, 硕士研究生, 现主要从事葡萄种质资源与生物技术育种研究工作。E-mail: zhaokai2005zjj@163.com.

**责任作者:**张剑侠(1964-), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 现主要从事果树育种的科学与科研工作。E-mail: zhangjx666@126.com.

**基金项目:**国家现代农业产业技术体系建设专项基金资助项目(CARS-30-yz-7); 陕西省科技攻关资助项目(2011K02-10)。

**收稿日期:**2013-04-09

传统的无核育种是以有核葡萄为母本与无核葡萄进行杂交, 如新品种‘瑞香无核’、‘无核脆宝’, 即以这种方法选育获得, 但该方法杂交后代中无核率较低, 一般为 0~15.9%<sup>[2]</sup>。1982 年, Ramming 等<sup>[3]</sup>首次以无核葡萄作母本, 通过对胚珠进行体外培养获得了后代, 创建了无核葡萄胚挽救技术; 该技术的应用不仅使采用假单性结实的无核葡萄品种作母本成为现实, 而且可使杂交后代的无核率达到 82%, 且缩短育种年限 4~5 a, 目前胚挽救技术已成为国内外无核葡萄育种的重要方法而被广泛应用<sup>[4-7]</sup>。无核葡萄品质优良, 但抗寒性差, 限制了其在寒冷地区的发展。中国野生葡萄资源丰富, 其中的山葡萄抗寒性最强, 能耐-40℃的低温, 是十分重要的抗寒种质资源<sup>[8-10]</sup>。因此将山葡萄的抗寒性与无核葡萄的无核及优质的特性相结合是抗寒无核葡萄育种的

**Abstract:** To satisfy the need of sand watermelon industry in Ningxia, taking ‘Ningnongke No. 1’ watermelon as material, using three factors and five levels of quadratic regression general rotation design, under the conditions of the sand, the effect of different irrigation amount, different organic fertilizer amount, different oil scrap fertilizer amount and water-fertilizer coupling on the yield of sand watermelon were studied, and the main factors effect, single factor effect and interaction of them were analyzed. The results showed that effect of main factors on the yield were Irrigation amount  $X_1$  (positive effect) > Organic fertilizer  $X_2$  (positive effect) > Oil scrap fertilizer  $X_3$  (positive effect); interaction between factors on the yield were: Irrigation amount × Organic fertilizer (positive effect) > Irrigation amount × Oil scrap fertilizer (negative effect) > Organic fertilizer × Oil scrap fertilizer (negative effect). Agronomic measures of yield greater than 2 000 kg/667m<sup>2</sup> were irrigation amount 3.51~4.24 kg per plant everytime, organic fertilizer 339.2~425.2 kg/667m<sup>2</sup>, oil scrap fertilizer 21.0~25.7 g per plant everytime.

**Key words:** sand field; watermelon; water-fertilizer coupling; mathematical model; optimized scheme

一个有效策略。唐冬梅等<sup>[11]</sup>以中国野生山葡萄‘双优’及‘黑龙江实生’为父本,分别与欧洲无核葡萄‘底莱特’和‘火焰无核’杂交获得了抗病抗寒新种质。该研究以7个种子败育型无核葡萄品种为母本,以抗寒的2个欧山杂种为父本进行杂交,研究不同的培养基配方、不同种类氨基酸以及亲本基因型对胚发育率及成苗率的影响,以期通过该研究创制抗寒无核葡萄新种质,为抗寒无核葡萄新品种的选育奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试母本为种子败育型无核葡萄品种‘火焰无核’、‘京大晶’、‘红宝石无核’、‘红无籽露’、‘大粒红无核’、‘皇家秋天’及‘波尔莱特’,父本为欧山杂种‘00-1-5’(‘玫瑰香’×‘山葡萄黑龙江实生’),‘北醇’(‘玫瑰香’×‘山葡萄’).

### 1.2 试验方法

1.2.1 田间杂交 试验于2012年5~12月在西北农林科技大学葡萄种质资源圃、新疆维吾尔自治区葡萄瓜果开发研究中心和旱区作物逆境生物学国家重点实验室进行。参照牛茹萱等<sup>[12]</sup>的方法,选择母本植株上发育一致的花穗若干,花前2~3 d掐去穗尖并于上午8:00~11:00去雄,不能伤及柱头。对去雄后的花穗喷水保持柱头湿润及防止花粉污染,套袋并挂牌标记。去雄后2~3 d,当柱头分泌水滴状粘液时,即可用棉花蘸取花粉进行人工授粉。之后每隔24 h授粉1次,连续3次,并记录去雄及授粉时间。

1.2.2 胚发育培养基的设置 ER培养基分别添加有机物及激素;设3种处理分别为:1号培养基:ER基本培养基;2号培养基:ER+水解酪蛋白(CH)500 mg/L;3号培养基:ER+CH 500 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L+IAA 1.5 mg/L。ER培养基添加不同氨基酸:分别为a:ER基本培养基;b:ER+脯氨酸1 mmol/L;c:ER+天冬氨酸1 mmol/L;d:ER+丝氨酸1 mmol/L;e:ER+烟酸1 mmol/L;f:ER+甘氨酸1 mmol/L;g:ER+半胱氨酸1 mmol/L;以上均采用固液双相培养基。

1.2.3 胚萌发成苗培养基 WPM+BA 0.2 mg/L。

1.2.4 胚挽救的方法 参考前人对无核葡萄做母本胚珠接种时期的研究<sup>[13-16]</sup>,该试验设定中熟品种‘火焰无核’、‘京大晶’、‘红宝石无核’、‘红无籽露’、‘大粒红无核’、‘波尔莱特’的采样时期分别为授粉后45、59、54、50、50、55 d,晚熟品种‘皇家秋天’的采样时期为授粉后66 d。具体操作方法为:以授粉日期作为取材时期的第0天,在生长至要求天数后摘取果穗带回实验室。将带有1~2 mm果柄的果粒用剪刀剪下,放入纱网,于流水下冲洗30~45 min,将冲洗后的果粒置于超净工作台上用75%的乙醇浸泡30~60 s,然后用无菌水冲洗3次,再次将浆

果放入0.1%升汞溶液中浸泡20~25 min,最后用无菌水冲洗3~5次。用手术刀将果粒切开,从剖开的果粒中选取长度大于2 mm的胚珠,将其接种在ER固液双相培养基中,每个三角瓶(100 mL)内接种15个胚珠。暗培养60 d后在解剖镜下剖开胚珠,在喙端发现的白色胚即为发育胚,统计发育胚的胚珠数量。之后将发育胚接种到萌发成苗培养基上培养成苗,统计成苗胚的胚珠数量。培养室温度为(25±1)℃,光照2 000 lx,每天12~14 h。胚珠发育率(%)=发育胚数/培养胚珠数×100%;成苗率(%)=成苗数/培养胚珠数×100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养基对胚挽救效果的影响

将8个组合的胚珠分别接种到ER基本培养基(1号培养基)、ER+CH 500 mg/L培养基(2号培养基)、ER+CH 500 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L+IAA 1.5 mg/L(3号培养基)培养基中培养。由表1可知,培养基不同,胚发育率及成苗率也不同。2号培养基与1号培养基相比,平均胚的发育率有所降低,而平均成苗率略有提高。但是,‘京大晶’×‘00-1-5’、‘红宝石无核’×‘00-1-5’、‘红无籽露’×‘00-1-5’组合在2号培养基上胚的发育率和成苗率较1号培养基上均有所提高,其中‘京大晶’×‘00-1-5’的胚发育率及成苗率在2号培养基上分别达到40.00%和8.33%,说明添加500 mg/L CH对这3个组合胚的发育率和成苗率存在促进作用。3号培养基在2号培养基的基础上添加了0.5 mg/L GA<sub>3</sub>和1.5 mg/L IAA,在该培养基中平均胚的发育率和成苗率均较前2种培养基有一定的提高,说明这2种激素对胚的发育是需要的。运用卡方分析,以1号培养基中平均胚发育率和成苗率为对照,分别对2号和3号培养基中平均胚发育率和成苗率进行显著性分析,表明添加CH和GA<sub>3</sub>+IAA对胚发育率及成苗率不存在显著影响。

### 2.2 氨基酸对胚挽救效果的影响

在ER基本培养基中分别添加1 mmol/L丝氨酸、天冬氨酸、烟酸、半胱氨酸、甘氨酸和脯氨酸,并以ER基本培养基作对照,在这些培养基上分别接种‘波尔莱特’×‘北醇’的杂交胚珠进行培养。由表2可知,对照中胚的发育率为8.89%,添加丝氨酸使胚的发育率达到20.74%;天冬氨酸和半胱氨酸的添加使胚的发育率略有提高,分别达到10.67%和11.67%,说明丝氨酸、天冬氨酸及半胱氨酸的添加能提高胚的发育率。但添加烟酸、甘氨酸及脯氨酸时胚的发育率与对照相比有所降低,说明这3种氨基酸对胚的发育率无促进作用,甚至产生了抑制作用。丝氨酸的添加比其它5种氨基酸更能促进胚的成苗率,达到7.41%。运用卡方分析,以CK中胚发育率和成苗率为对照,分别对各氨基酸组合中胚发育率及成苗率进行显著性分析,结果表明在0.05水平上,

表 1 培养基中添加 CH 及 GA<sub>3</sub> + IAA 对胚挽救的影响Table 1 The effect of CH and GA<sub>3</sub> + IAA in medium on embryo rescue

培养基 Medium	杂交组合(♀×♂) Crosses	胚珠数 No. of ovules /个	发育胚数 No. of embryos developed/个	成苗数 No. of normal seedlings/个	胚发育率 Proportion of embryos developed/%	成苗率 Proportion of seedlings/%
1 号培养基 ER(No. 1)	‘火焰无核’×‘00-1-5’‘Flame Seedless’×‘00-1-5’	45	5	0	11.11	0
	‘京大晶’×‘00-1-5’‘Jingdajing’×‘00-1-5’	105	39	5	37.14	4.76
	‘红宝石无核’×‘00-1-5’‘Ruby Seedless’×‘00-1-5’	140	8	0	5.71	0
	‘红无籽露’×‘00-1-5’‘Sultanina Rose’×‘00-1-5’	65	4	0	6.15	0
	‘红无籽露’×‘北醇’‘Sultanina Rose’×‘Beichun’	45	6	1	13.33	2.22
	‘大粒红无核’×‘00-1-5’‘Dalihong Seedless’×‘00-1-5’	30	4	0	13.33	0
	平均值 Average				15.35	1.40
2 号培养基 ER+CH 500 mg/L(No. 2)	‘火焰无核’×‘00-1-5’‘Flame Seedless’×‘00-1-5’	12	0	0	0	0
	‘京大晶’×‘00-1-5’‘Jingdajing’×‘00-1-5’	60	24	5	40.00	8.33
	‘红宝石无核’×‘00-1-5’‘Ruby Seedless’×‘00-1-5’	135	8	0	5.92	0
	‘红无籽露’×‘00-1-5’‘Sultanina Rose’×‘00-1-5’	45	6	0	13.33	0
	‘皇家秋天’×‘00-1-5’‘Royal Autumn’×‘00-1-5’	135	10	1	7.40	0.74
	‘皇家秋天’×‘北醇’‘Royal Autumn’×‘Beichun’	15	3	1	20.00	6.67
	平均值 Average				12.69	1.74
3 号培养基 ER+CH 500 mg/L+ GA <sub>3</sub> 0.5 mg/L+ IAA 1.5 mg/L(No. 3)	‘火焰无核’×‘00-1-5’‘Flame Seedless’×‘00-1-5’	150	19	1	12.67	0.67
	‘京大晶’×‘00-1-5’‘Jingdajing’×‘00-1-5’	75	25	5	33.33	6.67
	‘皇家秋天’×‘00-1-5’‘Royal Autumn’×‘00-1-5’	30	3	3	10.00	10.00
	‘皇家秋天’×‘北醇’‘Royal Autumn’×‘Beichun’	30	3	0	10.00	0
	平均值 Average				17.54	3.16

表 2 ER 培养基中添加不同氨基酸对胚挽救的影响

Table 2 The effect of supplementation different amid acid in ER medium on embryo rescue

杂交组合(♀×♂) Crosses	附加物 Addition	胚珠数 No. of ovules /个	发育胚数 No. of embryos developed/个	成苗数 No. of normal seedlings/个	胚发育率 Proportion of embryos developed/%	成苗率 Proportion of seedlings/%
‘波尔莱特’×‘北醇’ ‘Perlette’×‘Beichun’	对照(CK)	45	4	0	8.89	0
	丝氨酸 Serine	135	28	10	20.74	7.41
	天冬氨酸 Aspartic acid	75	8	2	10.67	2.67
	烟酸 Niacin	120	2	1	1.67	0.83
	半胱氨酸 Cysteine	60	7	1	11.67	1.67
	甘氨酸 Glycine	135	7	1	5.19	0.74
	脯氨酸 Proline	150	9	2	6.00	1.33

丝氨酸和烟酸的添加对胚发育率有显著性影响;丝氨酸的添加对成苗率有显著性影响。

### 2.3 父母本基因型对无核葡萄胚挽救的影响

由表 3 可知,在以‘00-1-5’为父本的 5 个杂交组合中,以‘京大晶’为母本获得了最大的胚发育率及成苗率,分别为 36.66%和 4.16%。这表明在以‘00-1-5’为父

本时,‘京大晶’比其它 4 种无核葡萄品种更适于作母本。运用卡方分析,以‘红宝石无核’胚发育率及成苗率为对照,分别对各母本中胚发育率及成苗率进行显著性分析,结果表明在 0.05 水平上以‘京大晶’为母本对胚发育率和成苗率具有显著性影响。在以‘北醇’为父本的杂交组合中,‘红无籽露’及‘皇家秋天’获得了相同的胚发

表 3 父母本基因型对胚挽救的影响

Table 3 The effect of parents genotype on embryo rescue

父本 Male parent	母本 Female parent	胚珠数 No. of ovules /个	发育胚数 No. of embryos developed/个	成苗数 No. of normal seedlings/个	胚发育率 Proportion of embryos developed/%	成苗率 Proportion of seedlings/%
‘00-1-5’	‘火焰无核’‘Flame seedless’	207	24	1	11.59	0.48
	‘红宝石无核’‘Ruby Seedless’	275	16	0	5.82	0
	‘红无籽露’‘Sultanina Rose’	110	10	0	9.09	0
	‘京大晶’‘Jingdajing’	240	88	10	36.66	4.16
	‘大粒红无核’‘Dalihong Seedless’	30	4	0	13.33	0
	‘皇家秋天’‘Royal Autumn’	165	13	3	7.88	1.82
‘北醇’Beichun	‘红无籽露’‘Sultanina Rose’	45	6	1	13.33	2.22
	‘皇家秋天’‘Royal Autumn’	45	6	1	13.33	2.22



育率及成苗率,分别为 13.33%和 2.22%。这说明分别以‘红无籽露’及‘皇家秋天’作母本对胚的发育率及成苗率影响不大。以‘红无籽露’、‘皇家秋天’作母本,分别以‘00-1-5’和‘北醇’作父本,胚的发育率和成苗率存在一定差异,以‘北醇’作父本比‘00-1-5’作父本的胚发育率和成苗率有所提高。卡方分析结果表明,分别以‘北醇’和‘00-1-5’为父本对胚发育率及成苗率影响不显著。

### 3 讨论与结论

在无核葡萄胚挽救中,影响胚发育率、成苗率的因素很多,如父母本的基因型、取样时期、基本培养基及其形态、添加有机物种类与浓度、培养条件等,从前人和课题组多年来的胚挽救结果看,在确定培养条件和取样时期后,父母本基因型、培养基及其附加物最为重要。

ER 培养基是目前认为较为理想的胚发育培养基<sup>[17]</sup>。关于胚珠内胚的发育是否需要添加外源激素,目前尚存在分歧。Raghavan<sup>[18]</sup>认为未成熟胚处于异养阶段,通常需要激素才能正常发育。多数研究者认为,尽管发育到一定阶段的幼胚已进入自养阶段,培养基中附加适宜的外源激素对胚的发育有促进作用<sup>[19-21]</sup>。Singh 等<sup>[20]</sup>研究认为 IAA 4 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L 的激素组合最有利于胚的萌发。Tian 等<sup>[21]</sup>研究认为,NN 培养基添加 0.1 μM GA<sub>3</sub> 和 10.0 μM IAA 能显著提升体胚获得率,但这种情况在 ER 及 MS 培养基上不明显。在该研究中,添加 GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L+IAA 1.5 mg/L 激素组合的培养基上胚的平均发育率及成苗率与未添加激素的培养基相比,分别由 12.69%和 1.74%上升到 17.54%和 3.16%,说明激素的添加对胚发育率及成苗率有一定的促进作用。

水解酪蛋白是氨基酸、多肽、蛋白质的混合物,水解酪蛋白含有 18 种植物生长所需的氨基酸,它们作为有机添加物广泛用于植物组织培养,在烟草、苜蓿、小麦等植物上已有相关报道。在该研究中发现添加水解酪蛋白培养基上胚的成苗率平均为 1.74%,而未添加水解酪蛋白的培养基上胚的成苗率平均为 1.40%,说明水解酪蛋白对胚的成苗率可能存在一定的促进作用。卡方分析结果表明,CH 和 GA<sub>3</sub>+IAA 的添加对胚发育率及成苗率的促进作用不存在显著影响。

在无核葡萄胚挽救研究中,Emershad 等<sup>[22]</sup>首次提出了半胱氨酸、天冬酰胺、丝氨酸和谷氨酰胺对无核白胚发育、萌发和成苗表现为促进作用。王爱玲等<sup>[14]</sup>研究不同氨基酸对胚珠发育的影响,认为 ER+4 mmol/L 丝氨酸和 ER+4 mmol/L 天冬酰胺对胚萌发和成苗有促进作用,而脯氨酸、胱氨酸和苯丙氨酸均抑制胚萌发,其中 ER+4 mmol/L 天冬酰胺培养基上培养杂交幼胚,胚萌发率和成苗率最高,分别达到 60.0%和 3.3%。Tian

等<sup>[21]</sup>研究认为天冬氨酸、甘氨酸、精氨酸、谷氨酰胺有益于‘爱莫无核’×‘北醇’组合中胚的成苗。该研究发现丝氨酸、天冬氨酸及半胱氨酸的添加能提高胚发育率,特别是添加丝氨酸使胚发育率达到 20.74%(对照为 8.89%),而且丝氨酸比其它 5 种氨基酸更能促进胚的成苗率,通过卡方分析结果表明丝氨酸的促进作用显著,这与田莉莉<sup>[23]</sup>的研究结果一致。

亲本基因型是决定胚挽救是否成功的另一关键因素。前人研究认为,不同品种作母本进行杂交,胚挽救效果差异较大,父本对胚挽救结果也有影响<sup>[10,12,24-25]</sup>。Nicole 等<sup>[24]</sup>对胚挽救中各影响因素进行研究认为,母本基因型对胚发育率及成苗率影响最大,以‘红宝石无核’及‘红无核’作母本,胚发育率最大,分别为 68%和 40%,但以‘超级无核’和‘黑无核’作母本,胚发育率仅为 30%。牛茹萱等<sup>[12]</sup>研究认为在以‘波尔莱特’和‘红无籽露’分别作母本的胚挽救中,基因型对胚的发育率和成苗率的影响差异不大,‘波尔莱特’略优于‘红无籽露’;但 4 个父本基因型对胚挽救效果影响较大,以欧山杂种‘00-1-10’和‘北醇’作父本的杂交组合胚的发育率和成苗率明显高于山葡萄‘黑龙江实生’、‘双优’作父本的杂交组合。王爱玲等<sup>[14]</sup>研究认为当以‘火焰无核’作为杂交父本时,以‘00-3-1’(‘爱莫无核’×‘蓼蓼葡萄泰山-2’)和‘底莱特’为母本得到的胚萌发率明显高于以‘奇妙无核’为父本的组合;在以‘底莱特’为母本,‘火焰无核’、‘红宝石无核’、‘无核紫’为父本的组合中,胚的发育率、胚萌发率及胚成苗率不尽相同。Tian 等<sup>[25]</sup>研究表明,基因型不同,胚获得率、体胚萌发率及成苗率存在差异。在该研究中发现,以欧山杂种‘00-1-5’为父本的 5 个杂交组合中,‘京大晶’比其它 4 种无核葡萄品种更适于作母本。在以‘北醇’为父本的杂交组合中,以‘红无籽露’或‘皇家秋天’为母本时在胚发育率及成苗率方面没有差异。以‘北醇’作父本比‘00-1-5’作父本时胚的发育率和成苗率有所提高,但差异并不显著。‘北醇’和‘00-1-5’同为欧山杂种,但出现胚发育率和成苗率的差异的原因,尚需进一步研究。

### 参考文献

- [1] Cain D, Emershad R, Tarailo R. In ovule embryo culture and seedling development of seeded and seedless grapes (*Vitis vinifera* L.) [J]. Vitis, 1983, 22: 9-14.
- [2] Iwahori S, Weaver R J, Pool R M. Gibberellin-like activity in berries of seeded and seedless Tokay grapes [J]. Plant Physiol, 1968, 43: 333-337.
- [3] Ramming D W, Emershad R L. In-ovule embryo culture of seeded and seedless *V. vinifera* L. [J]. Hortsci, 1982, 179(3): 487.
- [4] Ramming D W. The use of embryo culture in fruit breeding [J]. Hort Science, 1990, 25: 393-398.
- [5] Liu S M, Sykes S R. Improved in ovules embryo culture for stenocarpic grapes (*Vitis vinifera* L.) [J]. Australian Journal of Agricultural Research, 2003, 54(9): 869-876.

- [6] Yamamoto, Iketani T H, Ieli H, et al. Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens [J]. Plant Cell Reports, 2000, 19: 639-646.
- [7] Tang D M, Wang Y J, Cai J S, et al. Effects of exogenous application of plant growth regulators on the development of ovule and subsequent embryo rescue of stenospermic grape (*Vitis vinifera* L.) [J]. Scientia Horticulturae, 2009, 120(1): 51-57.
- [8] 贺普超, 晁无疾. 我国葡萄属野生种质资源的抗寒性分析[J]. 园艺学报, 1982, 9(3): 17-21.
- [9] 贺普超, 牛立新. 我国葡萄属野生种抗寒性的研究[J]. 园艺学报, 1989, 16(2): 81-88.
- [10] Zhang J, Wu X, Niu R, et al. Cold-resistance evaluation in 25 wild grape species [J]. Vitis, 2012, 51(4): 153-160.
- [11] 唐冬梅, 王跃进. 无核葡萄胚挽救技术及种质创建[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.
- [12] 牛茹萱, 张剑侠, 王跃进, 等. 抗病抗寒无核葡萄胚挽救研究[J]. 果树学报, 2012, 29(5): 825-829.
- [13] 唐冬梅, 王跃进, 赵荣华, 等. 无核葡萄胚挽救中影响胚发育的因子[J]. 中国农业科学, 2009, 42(7): 2449-2457.
- [14] 王爱玲, 王跃进, 唐冬梅, 等. 提高无核葡萄胚挽救中幼胚成苗率的研究[J]. 中国农业科学, 2010, 43(20): 4238-4245.
- [15] 牛茹萱, 张剑侠, 王跃进, 等. 种子败育型无核葡萄胚挽救研究[J]. 北方园艺, 2012(7): 1-5.
- [16] 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.
- [17] 刘三军, 蒯传化, 于巧丽, 等. 葡萄无核性状遗传与胚挽救技术的研究及应用[J]. 果树学报, 2009, 26(1): 71-76.
- [18] Raghavan V. Embryo culture [M]. International Review of Cytology, 1961, II: 209-240.
- [19] Gray D J, Fisher L C, Mortensen J A. Comparison of methodologies for in ovule embryo rescue of seedless grapes [J]. Hort Science, 1987, 22(6): 1334-1335.
- [20] Singh N V, Singh S K, Singh A K. Standardization of embryo rescue technique and bio-hardening of grape hybrids (*Vitis vinifera* L.) using Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) under sub-tropical conditions [J]. Vitis, 2011, 50(3): 115-118.
- [21] Tian L L, Wang Y J, Niu L, et al. Breeding of disease-resistant seedless grapes using Chinese wild *Vitis* spp. I. *In vitro* embryo rescue and plant development [J]. Scientia Horticulturae, 2008, 117: 136-141.
- [22] Emershad R L, Ramming D W. In ovule embryo culture of *Vitis vinifera* L. cv. 'Thompson Seedless' [J]. American Journal of Botany, 1984, 71(6): 873-877.
- [23] 田莉莉. 抗病无核葡萄胚挽救育种及种质创新[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [24] Nicole Hewstone O, Jorge Valenzuela B, Carlos Muñoz Sch. Cultivar effect in the development of stenospermocarpic grape embryos cultured in vitro [J]. Agricultura Técnica, 2006, 66(2): 124-132.
- [25] Tian L L, Wang Y J. Seedless grape breeding for disease resistance by using embryo rescue [J]. Vitis, 2008, 47(1): 15-19.

## Impacting Factors on Embryo Rescue of Seedless Grape with Cold Resistance

ZHAO Kai, LIU Qiao, ZHANG Jian-xia, NIU Ru-xuan, LI Gui-rong, WANG Yue-jin

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology and Germplasm Innovation in Northwest China, State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Area, College of Horticulture, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** Taking 7 cultivars of stenospermocarpic seedless grape as female, 2 cultivars of interspecific hybrids as male, the embryo rescue was done with hybrid ovule inoculated on medium. Effect of different ovule culture media, supplementation of different amino acid and different genotype on embryo rescue in-vitro were studied using the ovules from 8 cross combinations. The results indicated that among three medias used for culturing ovules on ER+CH 500 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L+IAA 1.5 mg/L medium got the highest germination rate and seedling ratio. But added CH and GA<sub>3</sub>+IAA had no appreciable impact on proportion of embryos developed and seeding ratio. Supplementation of different amino acid had different effect on the proportion of embryo development and seedling rate. Particularly, among all the tested amino acids, Ser of 1 mmol/L had remarkable promoting effect in the cross combination of 'Perlette'×hybrid 'Beichun' (*V. vinifera* cv. 'Muscat Hamburg'×*V. amurensis*). While, supplement of Niacin in the media perform contrarily by inhibiting the development of the embryo. In six cross combinations which whose male parent was '00-1-5' ('Muscat Hamburg'×*Vitis amurensis* accession 'Heilongjiang Seedling'), when stenospermocarpic seedless cultivar 'Jingdajing' (*V. vinifera*) as female parent it can obtain the largest proportion of embryo development and seedling rate. Among the two cross combinations of stenospermocarpic seedless cultivar 'Royal Autumn'×'Beichun' and 'Sultanina Rose'×'Beichun', 'Royal Autumn' was good to be a female as well as 'Sultanina Rose'. When used 'Beichun' as a male, it got higher embryo development rate and germination rate than '00-1-5', but the result was not significant. Thirty-nine new seedless grape germplasms with cold resistant were obtained by embryo rescue technology.

**Key words:** seedless grape; cold resistance; germplasm; embryo rescue