

# 无核葡萄胚挽救畸形苗发生及转变正常植株的研究

李桂荣<sup>1,2</sup>, 全冉<sup>1</sup>, 程珊珊<sup>1</sup>, 侯小进<sup>1</sup>, 蔡祖国<sup>1</sup>, 扈惠灵<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>河南科技学院园艺园林学院, 河南新乡 453003; <sup>2</sup>河南省园艺植物资源利用与种质创新工程研究中心, 河南新乡 453003)

**摘要:**【目的】探究胚挽救无核葡萄畸形苗发生原因及转变成正常葡萄试管苗的方法, 提高无核葡萄胚挽救育种效率。【方法】‘无核白’(‘Thompson seedless grape’)、‘火焰无核’(‘Flame seedless grape’)、‘赫什无核’(‘Heshi seedless grape’)及‘红宝石无核’(‘Ruby seedless grape’)自交以及和不同父本杂交后进行胚挽救, 研究不同亲本基因型和不同胚萌发培养基对胚挽救畸形苗产生的影响。通过不同培养基及培养方式离体培养胚挽救畸形苗, 进一步研究胚挽救畸形苗转变成正常葡萄试管苗的方法。【结果】‘无核白’和‘赫什无核’作母本, 用MS培养基培养易产生胚挽救畸形苗。畸形胚萌发苗可总结为5大类: 白化苗、玻璃化苗、徒长苗、子叶扭曲无根苗和无生长点的有根苗。转接在WPM+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+IAA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+琼脂 6 g·L<sup>-1</sup>+蔗糖 20 g·L<sup>-1</sup>+活性炭 2.0 g·L<sup>-1</sup>培养基上培养, 每隔14 d进行继代转接, 将畸形苗转变成正常葡萄试管苗效果较好。【结论】无核葡萄胚挽救产生的畸形苗及时转接到不同培养基上或者采取合适方式进行继代培养, 可以将胚挽救畸形苗转变成正常葡萄试管苗。

**关键词:** 无核葡萄; 胚挽救; 畸形胚挽救苗; 正常葡萄试管苗; 驯化移栽

中图分类号: S663.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2020)06-0819-11

## A study of abnormal seedling occurrence from rescued embryos of seedless grapes and their transformation into normal seedlings

LI Guirong<sup>1,2</sup>, QUAN Ran<sup>1</sup>, CHENG Shanshan<sup>1</sup>, HOU Xiaojin<sup>1</sup>, CAI Zuguo<sup>1</sup>, HU Huiling<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Horticulture and Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, Henan, China; <sup>2</sup>Henan Province Engineering Research Center of Horticultural Plant Resource Utilization and Germplasm Enhancement, Xinxiang 453003, Henan, China)

**Abstract:** 【Objective】The objective of this study was to explore the causes of abnormal plantlets in the process of embryo rescue of seedless grapes and to find effective measures to prevent the occurrence abnormal seedlings. With embryo rescue, efficiency of seedless grape breeding can be improved. 【Methods】Abnormal seedlings were used as the test materials. These abnormal seedlings developed from embryos rescued *in vitro* from self-pollination of four seedless grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars (‘Thompson seedless’ ‘Flame seedless’ ‘Heshi seedless’ and ‘Ruby seedless’) and embryos from different crosses of seedless grapes. The effects of different parent genotypes and different embryo germination media on the emergence of abnormal seedlings rescued from seedless grape embryos were studied. The 4 different parent genotypes were ‘Thompson seedless’ ‘Flame seedless’ ‘Heshi seedless’ and ‘Ruby seedless’. The 5 different media were MS, MM3, MM4, ER, and modified MM3. Different methods for transforming abnormal seedlings into normal seedlings were studied *in vitro*. The methods included 4 different culture media and different subculture durations. The media included WPM (W1), WPM + 6-BA 2.0mg·L<sup>-1</sup> (W2), WPM + 6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+ IAA 2.0 mg·L<sup>-1</sup> (W3) and WPM + IAA 2.0 mg·L<sup>-1</sup> (W4). These media were all added with agar 6 g·L<sup>-1</sup>+ sucrose 20 g·L<sup>-1</sup>+ activated carbon 2.0 g·L<sup>-1</sup>. Normal seedlings were observed and their number was counted after 45 days. The different subculture

收稿日期: 2020-01-20 接受日期: 2020-03-10

基金项目: 河南省自然科学基金(182300410045)

作者简介: 李桂荣, 女, 副教授, 博士, 从事园艺植物生物技术育种研究。Tel: 13569430110, E-mail: liguirong10@163.com

\*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0373-3040938, E-mail: hu-huiling@163.com

durations were 7 d, 14 d, 21 d and 28 d, and normal seedlings were counted after 60 days. 【Results】 It was difficult to rescue ‘Thompson seedless’ embryos. The proportion of abnormal seedlings from rescued embryos of ‘Thompson seedless’ and ‘Heshi seedless’ was higher than that from the other cultivars. The 5 embryos development media were used to culture *in vitro* embryos from self-pollination of the four seedless grape cultivars. The percentage of abnormal seedlings was always highest on the MS medium. The percentage of abnormal seedlings of ‘Thompson seedless’ was 33.3%, ‘Flame seedless’ 37.5%, ‘Heshi seedless’ 33.3%, and ‘Ruby seedless’ 23.1%. The abnormal germination embryo rate of the 5 media followed a pattern of modified MM3 < MM3 < ER < MM4 < MS. Therefore, MS medium was not suitable to be used as the rescuing medium for seedless grape embryos. The abnormal grape seedlings were classified into 5 types: (1) albino seedlings, (2) vitrified seedlings, (3) seedlings with excessive growth, (4) plantlets with contorted cotyledon and no roots, and (5) plantlet without shoot tip. All these different types of abnormal seedlings could be transformed into normal seedlings using appropriate media. The percent of seedlings transformed to normal ones was highest (24.6%) when cultured on WPM+6-BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup>+IAA 2.0 mg · L<sup>-1</sup>, and lowest (8.1%) when cultured on WPM. After leggy seedlings were cut for subculture every 14 days, the percentage of normal seedlings was higher (33.3%) than other intervals. Albino and vitrified seedlings were not able to turn into normal seedlings. Finally, these normal seedlings were hardened and transplanted in the field, and the operation steps for seedling hardening and transplantation into fields were summarized. 【Conclusion】 Abnormal plantlet occurrence from rescued embryos of ‘Thompson seedless’, ‘Heshi seedless’ was high, especially cultured in MS medium. WPM+6-BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup>+IAA 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + agar 6 g · L<sup>-1</sup> + sucrose 20 g · L<sup>-1</sup> + activated carbon 2.0 g · L<sup>-1</sup> was suitable to normalize the abnormal seedlings. For leggy plantlets, the transformation rate was high with a subculture duration of 14 days, reaching 33.3%. The abnormal plantlets produced by embryo rescue of seedless grapes can be transferred to normal plantlets on proper media and subcultured in a proper way. The abnormal plantlets except albino plantlets and vitrified plantlets could be transformed into normal plantlets.

**Key words:** Seedless grape; Embryo rescue; Abnormal embryo rescue seedlings; Normal grape seedlings; Acclimation and transplantation

无核葡萄是当今世界葡萄消费和育种的重要方向之一。在美国,80%以上的鲜食葡萄由无核葡萄组成,98%以上的制干葡萄是无核葡萄。澳大利亚、南非及欧洲葡萄生产大国对无核葡萄的研究与开发也极为重视。无核葡萄的合子胚在发育过程中败育而不能发育成正常的种子,因而常规育种只能以无核品种作父本,杂交选育无核葡萄品种,但后代中无核概率低(0%~15.9%),育种效率低下。胚挽救技术可用于无核葡萄作母本的品种间杂交,后代无核性状比率高(45%~82%),育种效率高,极大地推动了无核葡萄育种的进程<sup>[1-7]</sup>。无核葡萄胚挽救育种技术主要是在离体条件下培养种子败育型无核葡萄的胚珠或者胚,使之充分发育最后萌发成苗<sup>[8-14]</sup>。Ramming 等<sup>[7]</sup>运用胚挽救技术进行无核葡

萄育种,获得了2株实生苗,在此基础上胚挽救无核葡萄育种技术体系不断成熟<sup>[1-6]</sup>。但在此过程中,研究者发现利用该技术培养胚珠或者胚除了能获得所需要的目标材料之外,一部分胚萌发后会出现畸形状态,被称为畸形胚苗,即畸形苗<sup>[3,14-18]</sup>。这些苗和前人研究<sup>[19-22]</sup>的畸形胚产生的苗不同,植物组织培养中体细胞胚的变异一般称为畸形胚,这些畸形胚需要利用再生体系才能获得试管苗。无核葡萄胚挽救过程中出现畸形苗的现象虽然已受到研究者的注意和报道,但对其成因及种质保存利用方面没有系统地开展相关研究<sup>[3,14-17]</sup>。因此,探讨无核葡萄胚挽救过程中畸形苗的成因以及今后如何采取有效措施预防和调控胚挽救成苗,获得更多的杂种材料正常苗子,具有十分重要的指导价值。本研究

主要是对胚挽救畸形苗直接再离体培养,而不经愈合伤组织途径转变成正常葡萄试管苗,获得的仍然是无核葡萄杂交后代实生苗,有助于获得更多的无核葡萄胚挽救杂交后代单株。从不同亲本基因型、不同培养方法对胚挽救过程中出现的畸形苗的影响因素出发,研究胚挽救畸形苗产生的原因;选择适宜的胚挽救畸形苗转变成正常葡萄试管苗的方法,获得了更多的无核葡萄杂交后代试管苗,进而对这些正常的葡萄试管苗进行驯化,移栽大田。分析胚萌发畸形葡萄苗产生的影响因素并获得了适宜的转变成正常葡萄试管苗的方法,有利于进一步提高无核葡萄育种效率。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

材料为胚挽救无核葡萄杂交组合过程中产生的畸形苗。

以种子败育型品质优良的欧亚种(*Vitis vinifera* L.)无核葡萄品种‘无核白’(‘Thompson seedless grape’)、‘火焰无核’(‘Flame seedless grape’)、‘赫什无核’(‘Heshi seedless grape’)及‘红宝石无核’(‘Ruby seedless grape’)为母本;以抗性强的中国野生葡萄(*Chinese wild grape*)‘塘尾’(‘Tangwei’)、‘雪峰’(‘Xuefeng’,刺葡萄 *V. davidii* Foex.)、‘双优’(‘Shuangyou’,山葡萄 *V. amurensis* Rupr.)和山欧杂交品种‘北醇’(‘Beichun’, *V. vinifera* × *V. amurensis*)为父本,无核葡萄品种‘无核白’‘火焰无核’‘赫什无核’和‘红宝石无核’为父本,优质欧亚种有核葡萄品种‘玫瑰香’(‘Muscat Hamburg’)、‘红地球’(‘Red Globe’)为父本进行杂交。杂交组合包括:(1)无核葡萄×中国野生葡萄组合共计16个:‘无核白’×‘双优’(T1),‘无核白’×‘北醇’(T2),‘无核白’×‘塘尾’(T3),‘无核白’×‘雪峰’(T4);‘火焰无核’×‘双优’(F1),‘火焰无核’×‘北醇’(F2),‘火焰无核’×‘塘尾’(F3),‘火焰无核’×‘雪峰’(F4);‘赫什无核’×‘北双优’(H1),‘赫什无核’×‘北醇’(H2),‘赫什无核’×‘塘尾’(H3),‘赫什无核’×‘雪峰’(H4);‘红宝石无核’×‘双优’(R1),‘红宝石无核’×‘北醇’(R2),‘红宝石无核’×‘塘尾’(R3),‘红宝石无核’×‘雪峰’(R4)。(2)无核葡萄×无核葡萄组合共计12个:‘无核白’×‘火焰无核’(T5),‘无核白’×‘赫什无核’(T6),‘无核白’×‘红宝石无核’

(T7);‘火焰无核’×‘无核白’(F5),‘火焰无核’×‘赫什无核’(F6),‘火焰无核’×‘红宝石无核’(F7);‘赫什无核’×‘无核白’(H5),‘赫什无核’×‘火焰无核’(H6),‘赫什无核’×‘红宝石无核’(H7);‘红宝石无核’×‘无核白’(R5),‘红宝石无核’×‘火焰无核’(R6),‘红宝石无核’×‘赫什无核’(R7)。(3)无核葡萄×有核葡萄组合共计8个:‘无核白’×‘玫瑰香’(T8),‘火焰无核’×‘玫瑰香’(F8);‘赫什无核’×‘玫瑰香’(H8),‘红宝石无核’×‘玫瑰香’(R8);‘无核白’×‘红地球’(T9),‘火焰无核’×‘红地球’(T9);‘赫什无核’×‘红地球’(H9),‘红宝石无核’×‘红地球’(R9)。(4)4个无核葡萄自交:‘无核白’自交(T10),‘火焰无核’自交(F10);‘赫什无核’自交(H10),‘红宝石无核’自交(R10)。

### 1.2 方法

1.2.1 胚萌发畸形葡萄苗的产生 不同杂交组合胚挽救畸形葡萄苗的产生:无核葡萄杂交组合进行胚挽救,然后观察统计发育胚数、正常萌发胚数和畸形萌发胚数,并以发育胚为基数计算畸形萌发胚率,畸形萌发胚率/%=畸形萌发胚数/发育胚总数×100。统计所有不同无核葡萄杂交组合胚挽救畸形萌发胚率,筛选不易产生胚挽救畸形苗的无核葡萄品种。

胚萌发基本培养基产生畸形葡萄苗的类型:总结前期课题组畸形苗产生过程中,胚萌发基本培养基对畸形苗产生的影响,设计了5种胚萌发基本培养基:MS、MM3、MM4、ER、改良MM3(附加成分:琼脂 6 g·L<sup>-1</sup>+蔗糖 20 g·L<sup>-1</sup>+活性炭 2.0 g·L<sup>-1</sup>, pH 值 5.8)。选取4种自然授粉的无核葡萄品种:‘无核白’(授粉受精后 37 d 取样),‘火焰无核’(45 d 取样),‘赫什无核’(60 d 取样)和‘红宝石无核’(65 d 取样),剥取胚珠接种到这5种培养基上,进行胚挽救。畸形萌发胚率%=畸形萌发胚数/发育胚总数×100,筛选不易产生胚挽救畸形苗的基本培养基。

1.2.2 胚挽救畸形苗转变成正常葡萄试管苗的试验 不同浓度激素组合离体培养胚挽救畸形苗的试验:选取无核葡萄胚挽救畸形苗为材料,直接取出接种到以下4种培养基(附加成分:琼脂 6 g·L<sup>-1</sup>+蔗糖 20 g·L<sup>-1</sup>+活性炭 2.0 g·L<sup>-1</sup>, pH 值 5.8)上培养:(1)WPM(W1);(2)WPM+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>(W2);(3)WPM+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+IAA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>



(W3); (4) WPM+IAA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>(W4)。培养 45 d 后观察统计正常葡萄试管苗数, 转变正常葡萄试管苗百分率/%=转变正常葡萄试管苗数/畸形苗总数×100。

不同转接时间离体培养胚挽救畸形苗的试验: 胚萌发过程中观察发现畸形苗中徒长苗数量较多, 将徒长苗剪切成靠近根部一个芽的茎段, 接种在 WPM+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>培养基(附加成分: 琼脂 6 g·L<sup>-1</sup>+蔗糖 20 g·L<sup>-1</sup>+活性炭 2.0 g·L<sup>-1</sup>, pH 值 5.8)上转接培养, 转接培养时间周期不同: (1)每 7 d 转接 1 次; (2)每 14 d 转接 1 次; (3)每 21 d 转接 1 次; (4)每 28 d 转接 1 次。60 d 后观察统计正常葡萄试管苗数, 转变正常葡萄试管苗百分率/%=转变正常葡萄试管苗数/畸形苗总数×100<sup>[18]</sup>。

1.2.3 培养室环境条件 培养条件为: 温度: (25±1)℃, 光照周期: 每天 16 h 光照, 光照强度 1 600 lx, 相对湿度 60%~70%。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同杂交组合及亲本对胚挽救畸形葡萄苗产生的影响

由表 1 可知, 无核葡萄×中国野生葡萄 16 个杂交组合的胚挽救过程中, ‘无核白’4 个杂交组合中, ‘无核白’×‘塘尾’胚挽救畸形苗率较高, 达到 33.3%。‘赫什无核’4 个杂交组合中, ‘赫什无核’×‘北醇’胚挽救畸形苗率较高, 达到 23.1%。‘红宝石无核’4 个杂交组合中, ‘红宝石无核’×‘塘尾’胚挽救畸形苗率较高, 达到 23.1%。‘火焰无核’4 个杂交组合中, ‘火焰无核’×‘北醇’胚挽救畸形苗率较高, 达到 16.7%。无核葡萄×无核葡萄 12 个杂交组合的胚挽救过程中, ‘无核白’3 个杂交组合中, ‘无核白’×‘红宝石无核’胚挽救畸形苗率较高, 达到 33.3%。‘赫什无核’3 个杂交组合中, ‘赫什无核’×‘无核白胚’挽救畸形苗率较高, 达到 28.6%。‘红宝石无核’3 个杂交组合中, ‘红宝石无核’×‘无核白’胚挽救畸形苗率较高, 达到 22.2%。‘火焰无核’3 个杂交组合中, ‘火焰无核’×‘红宝石无核’胚挽救畸形苗率较高, 达到 20.0%。无核葡萄×有核葡萄 8 个杂交组合的胚挽救过程中, ‘无核白’作母本, 2 个杂交组合没有获得胚挽救后代。‘赫什无核’2 个杂交组合中, ‘赫什无核’×‘红地球’胚挽救畸形苗率较高, 达到 24.3%, ‘红宝石无核’2 个杂交组合中, ‘红

宝石无核’×‘红地球’胚挽救畸形苗率较高, 达到 17.2%。‘火焰无核’2 个杂交组合中, ‘火焰无核’×‘红地球’胚挽救畸形苗率较高, 达到 13.8%。4 种自然授粉的无核葡萄胚挽救过程中, 畸形萌发胚率较低的是自然授粉的‘红宝石无核’葡萄, 仅为 12.3%; 自然授粉的‘赫什无核’畸形萌发胚率较高, 达到 21.9%。

综合以上 4 种结果发现: 4 种无核葡萄中, 作为杂交母本, ‘无核白’不易胚挽救成功, 且获得的胚挽救苗中畸形苗比例较高, ‘无核白’×‘塘尾’和‘无核白’×‘红宝石无核’2 个组合的畸形萌发胚率均达到了 33.3%; 其次是‘赫什无核’作为杂交母本, ‘赫什无核’×‘北醇’畸形萌发胚率为 23.1%, ‘赫什无核’×‘无核白’畸形萌发胚率为 28.6%, ‘赫什无核’×‘红地球’畸形萌发胚率为 24.3%, ‘赫什无核’自然授粉畸形萌发胚率为 21.9%。因此, 4 种无核葡萄作为母本, 进行杂交胚挽救育种, ‘红宝石无核’和‘火焰无核’不易诱导产生胚挽救畸形苗, 而‘无核白’和‘赫什无核’获得胚挽救畸形苗率偏高。而当母本相同时, 父本为‘塘尾’‘北醇’‘红宝石无核’‘无核白’‘红地球’进行杂交授粉产生的杂交组合进行胚挽救, 容易产生畸形萌发胚。

### 2.2 不同胚萌发基本培养基对胚挽救畸形苗产生的影响

由表 2 可知, 不同胚萌发基本培养基诱导离体胚珠中的胚发育, 对于发育状况的影响从畸形萌发胚率对比发现, 同一品种中不同基本培养基产生的畸形苗率不同, 其中‘无核白’胚挽救接种到 MS 培养基上畸形萌发胚率较高, 达到 33.3%, 其次是 MM4 培养基上畸形萌发胚率为 30.0%, 畸形萌发率最低的是 MM3 和改良 MM3 培养基, 畸形萌发胚率均为 8.3%; ‘火焰无核’胚挽救接种到 MS 培养基上畸形萌发胚率较高, 达到 37.5%, 其次是 ER 培养基上畸形萌发胚率为 18.9%, 畸形萌发率最低的是改良 MM3 培养基, 畸形萌发胚率均为 14.7%; ‘赫什无核’胚挽救接种到 MS 培养基上畸形萌发胚率较高, 达到 33.3%, 其次是 MM3 培养基上畸形萌发胚率为 25.0%, 改良 MM3 培养基畸形萌发胚率均为 19.4%; ‘红宝石无核’胚挽救接种到 MS 培养基上畸形萌发胚率较高, 达到 23.1%, 其次是 MM4 培养基上畸形萌发胚率为 20.5%, 畸形萌发率最低的是 MM3 培养基, 畸形萌发胚率为 13.5%, 改良

表1 不同杂交组合及亲本对胚挽救畸形葡萄苗产生的影响

Table 1 Effect of different crosses and parental genotypes on abnormal embryos developed

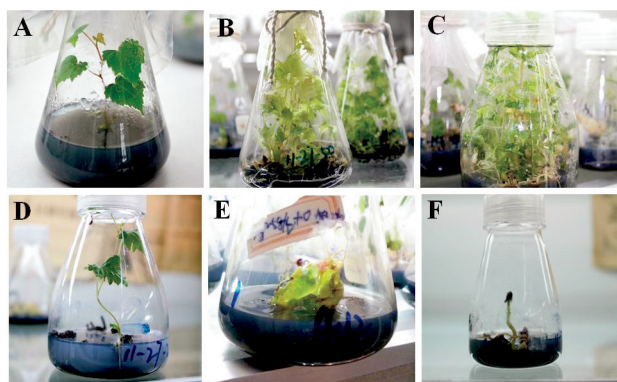
杂交组合 Crosses	接种胚珠数 No. of ovules cultured	发育胚数 No. of embryos developed	正常萌发胚数 No. of normal embryos developed	畸形萌发胚数 No. of abnormal embryos developed	畸形萌发胚率 Percentage of abnormal embryos developed/%
T1	9	3	1	0	0.0
T2	5	2	2	0	0.0
T3	8	3	0	1	33.3
T4	0	0	0	0	0.0
T5	7	2	0	0	0.0
T6	0	0	0	0	0.0
T7	8	3	1	1	33.3
T8	16	2	0	0	0.0
T9	36	6	3	0	0.0
T10	2 700	100	20	20	20.0
F1	45	6	5	1	16.7
F2	0	0	0	0	0.0
F3	83	22	6	3	13.6
F4	53	7	3	1	14.3
F5	0	0	0	0	0.0
F6	45	9	3	1	11.1
F7	36	5	2	1	20.0
F8	110	34	11	4	11.8
F9	223	29	9	4	13.8
F10	2 700	296	103	45	15.2
H1	177	26	5	6	23.1
H2	39	3	2	0	0.0
H3	251	36	11	7	19.4
H4	436	85	31	19	22.4
H5	59	7	3	2	28.6
H6	84	13	4	1	7.7
H7	107	17	6	3	17.6
H8	247	116	40	24	20.7
H9	666	82	28	20	24.3
H10	7 200	896	298	196	21.9
R1	437	123	91	12	9.8
R2	234	23	11	5	21.7
R3	87	13	5	3	23.1
R4	229	48	31	6	12.5
R5	97	9	4	2	22.2
R6	123	21	9	3	14.3
R7	236	39	18	6	15.4
R8	491	218	34	19	8.7
R9	469	87	52	15	17.2
R10	2 700	470	235	58	12.3

MM3 培养基畸形萌发胚率为 13.9%。综上所述,这 5 种培养基产生畸形萌发胚率从低到高的顺序依次为:改良 MM3 培养基、MM3 培养基、ER 培养基、MM4 培养基、MS 培养基,较易产生畸形萌发胚的基本培养基是 MS 培养基。

结合表 1 和表 2 培养过程产生的畸形苗,笔者提出将无核葡萄胚挽救过程中出现的畸形苗按照外观形态进行分类研究。由图 1 可知,无核葡萄胚挽救苗主要分为 2 大类型:第一种就是正常小苗。通常情况下,裸胚接种后迅速膨大,萌动并逐步萌

表2 不同胚萌发基本培养基对胚挽救畸形苗产生的影响  
Table 2 Effect of different basal mediums on abnormal embryos developed

杂交组合 Crosses	基本培养基 Basal medium	接种胚珠数 No. of ovules cultured	发育胚数 No. of embryos developed	正常萌发胚数 No. of normal embryos developed	畸形萌发胚数 No. of abnormal embryos developed	畸形萌发胚率 Percentage of abnormal embryos developed/%
T10	MS	300	3	1	1	33.3
	MM3	300	12	3	1	8.3
	MM4	300	10	2	3	30.0
	ER	300	11	2	3	27.3
	改良MM3 Modified MM3	300	12	3	1	8.3
F10	MS	300	8	2	3	37.5
	MM3	300	38	12	6	15.6
	MM4	300	30	6	5	16.7
	ER	300	37	11	7	18.9
	改良MM3 Modified MM3	300	34	14	5	14.7
H10	MS	300	9	3	3	33.3
	MM3	300	32	11	8	25.0
	MM4	300	27	8	5	18.5
	ER	300	32	8	6	18.8
	改良MM3 Modified MM3	300	36	9	7	19.4
R10	MS	300	26	13	6	23.1
	MM3	300	52	22	7	13.5
	MM4	300	39	29	8	20.5
	ER	300	45	29	7	15.6
	改良MM3 Modified MM3	300	79	45	11	13.9



A. 正常苗; B. 白化苗; C. 玻璃化苗; D. 徒长苗; E. 子叶扭曲无根苗; F. 无生长点的有根苗。

A. The normal plantlet; B. Albino seedlings; C. Vitrified seedlings; D. The seedling of excessive growth; E. The abnormal plantlet with contorted cotyledon and no roots; F. The abnormal plantlet without shoot tip.

图1 无核葡萄胚挽救形成的畸形苗

Fig. 1 Abnormal plantlets formation from seedless grape embryo rescue

发成苗,从胚萌发到成苗的离体发育过程中观察发现大多数的胚都能萌发形成完整的正常苗,正常苗胚萌发后上胚轴出现2片子叶,下胚轴形成主根或者没有主根,子叶转绿,继而发育成具有正常的根、茎、真叶及明显节和节间的正常小苗(图1-A)。第二种是畸形苗。畸形苗归纳为以下5种情况:(1)试管苗形成白化的畸形苗,称为白化苗;(2)试管苗呈现玻璃化,称为玻璃化苗;(3)萌发胚虽可见上、下胚轴明显伸长,但萌发后形成的试管小苗生长势弱,在发育过程中很容易夭亡,称为徒长苗;(4)子叶扭曲无根苗;(5)胚轴伸长,子叶狭小皱缩或者无子叶的畸形小苗(图1-B~G)。

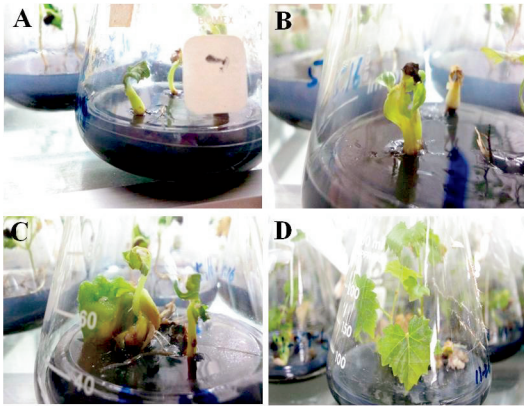
### 2.3 不同浓度激素组合对胚挽救畸形苗转变成正常葡萄试管苗的影响

在胚挽救无核葡萄各杂交组合过程中,将产生的畸形苗转接到4种不同浓度激素组合的培养基上进行培养,45 d后统计转变成正常葡萄试管苗的百分率。由表3和图2可知,合适的培养基有助于

表3 不同浓度激素组合对胚挽救畸形苗转变成正常葡萄试管苗的影响

Table 3 Effect of different media on transformation of the abnormal plantlet into normal plantlets

培养基种类 Medium types	畸形苗数 No. of abnormal plantlets	转变正常葡萄试管苗数 No. of normal plantlets transformation	转变正常葡萄试管苗百分率 Percentage of normal plantlets transformation/%
W1	99	8	8.1
W2	69	13	18.8
W3	69	17	24.6
W4	100	15	15.0



A. 畸形苗;B、C. 畸形苗的转变;D. 正常葡萄试管苗。

A. Abnormal plantlets; B, C. Transformation; D. A normal grape seedling.

图2 无核葡萄胚挽救畸形苗转变成的正常葡萄试管苗

Fig. 2 Normal grape seedlings transformed from abnormal seedlings generated from seedless grape embryo rescue

畸形苗生长点的萌发生长获得正常植株。培养基为 W3 时,畸形苗转变成正常葡萄试管苗百分率较高,达到 24.6%,其次是 W2 培养基,畸形苗转变成正常葡萄试管苗百分率为 18.8%。而将畸形苗转接到没有植物生长调节剂的 WPM 培养基上,转变成正常葡萄试管苗百分率最低,仅为 8.1%。综上所述比较适宜无核葡萄胚挽救过程中畸形胚萌发苗转变成正常苗的培养基是 WPM+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+IAA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+琼脂 6 g·L<sup>-1</sup>+蔗糖 20 g·L<sup>-1</sup>+活性炭 2.0 g·L<sup>-1</sup>。在试验中观察发现所有的白化苗和玻璃化苗最后都没有转变成正常苗。

#### 2.4 不同转接时间对畸形苗转变成正常苗的影响

分 4 个时间段转接畸形苗中的徒长苗,由表 4 可知,14 d 转接 1 次,对于徒长苗来说转变率较高,达到 33.3%,而且苗子生长逐渐强壮;其次是 21 d 转接 1 次,转变率为 20.0%,当转接时间为 28 d 时,

表4 不同转接时间对胚挽救畸形苗转变成正常苗的影响

Table 4 Effect of different subculture durations on the abnormal plantlet transformation

转接时间 Time/d	徒长苗数 No. of excessive growth -seedlings	转变正常葡萄苗数 No. of normal plantlets transformation	转变正常葡萄试管苗百分率 Percentage of normal plantlets transformation/%
7	30	3	10.0
14	30	10	33.3
21	30	6	20.0
28	30	2	6.7

苗子转变率逐渐开始下降,达到 6.7%。对于无核葡萄胚挽救徒长苗,需要及时切割转接,有利于转变生长变成正常葡萄试管苗。

#### 2.5 驯化移栽

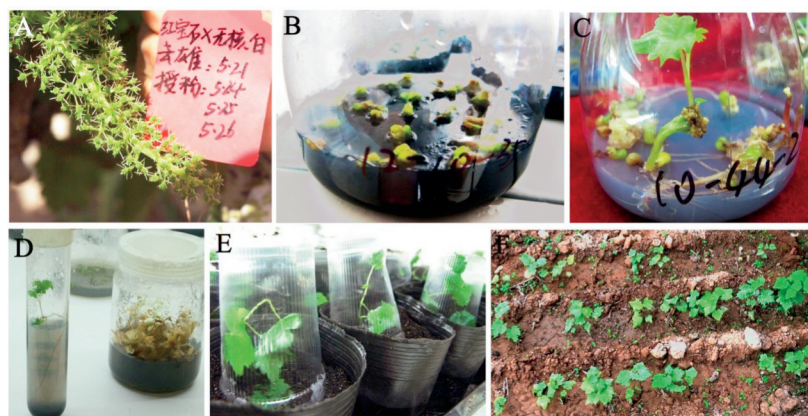
驯化移栽各个杂交组合胚挽救过程畸形胚萌发转变正常苗单株总数为 90 株,移栽苗成活率为 52.2%。总结驯化移栽苗具体操作步骤(图 3):首先将转变成的正常葡萄试管苗材料继代生根,长成 10 cm 左右高的苗子后,放在炼苗室内闭口炼苗 7~14 d。第 2 步移栽到装有移栽基质的营养钵中,用配制的营养液浇灌刚移栽的苗子,浇透,接着用透明塑料一次性杯子密封苗子,标记后把每个装有材

料的营养钵放进大托盘中,最后把所有移栽好的材料放进炼苗室培养架上进行驯化 30 d。第 3 步去除一次性杯子后待移栽的试管苗长势茁壮并长高 1~2 倍之后,将装有苗子的营养钵放置到温室中驯化 30 d。第 4 步将驯化好的苗子移至大棚圃地里,挂牌,按照田间管理的程序管理大棚圃地的移栽苗子。第 5 步:翌年春天 3 月定植大田。

### 3 讨论

提高无核葡萄胚挽救育种效率的影响因素很多<sup>[3-4,11,23-35]</sup>。预防畸形胚苗的产生是主要技术环节之一,无核葡萄胚挽救过程中畸形胚苗的产生受到很





A. 无核葡萄杂交授粉; B. 胚珠离体培养; C, D. 畸形苗的转变; E. 营养钵移栽驯化; F. 大田移栽。

A. Seedless grape hybrid pollination; B. Ovule cultured *in vitro*; C, D. Normal grape seedlings transformed from abnormal seedlings; E. Acclimation and transplantation in nutritive pots; F. Plantlets transplanted in field.

图3 胚挽救畸形苗转变成正常葡萄试管苗的驯化移栽

Fig. 3 Hardening and transplantation of normal seedlings transformed from abnormal seedlings generated from seedless grape embryo rescue

多因素的影响,包括不同亲本基因型、不同杂交组合、胚挽救选择的不同培养基组成以及离体培养环境条件等<sup>[3,14-15,17]</sup>。无核葡萄胚挽救畸形苗的产生首先受到亲本基因型的影响。Ji等<sup>[17]</sup>研究发现杂种畸形苗的形成主要受母本的基因型的影响。唐冬梅<sup>[16]</sup>在无核葡萄胚挽救育种过程中,研究了不同杂交组合对胚正常萌发的影响,结果发现‘黎明无核葡萄’×‘巨峰’胚挽救畸形苗率最高,达到55.6%,而‘底来特葡萄’×‘巨峰’和‘底来特葡萄’×‘高妻’的2个组合中均有胚萌发形成白化苗,而其他无核葡萄品种作母本的杂交组合均未产生白化苗,说明白化苗的发生主要受母本基因型影响。本试验发现4种无核葡萄作为母本进行杂交胚挽救苗畸形率不同,‘无核白’作为杂交母本胚挽救过程中容易产生畸形苗。前人<sup>[3,14-15,17,29,35]</sup>对‘无核白’作为亲本基因型对胚挽救畸形苗产生的影响没有研究。田莉莉<sup>[14]</sup>研究无核葡萄不同杂交组合对畸形苗的影响发现,‘红宝石无核’×‘新郁’、‘红宝石无核’×‘紫霞’和‘爱莫无核’×‘北醇’3个杂交组合胚挽救产生的畸形苗发生率较高,主要是受母本基因型的影响,其发现‘红宝石无核’作为母本胚挽救易产生畸形苗。Ji等<sup>[17]</sup>也研究发现‘红宝石无核’作为母本畸形苗率偏高,自然授粉‘红宝石无核’胚挽救畸形苗率达到了58%。而Valdez<sup>[36]</sup>研究‘红宝石无核’作为母本胚挽救时,发现杂交组合胚挽救苗畸形苗率偏低。本试验研究发现‘红宝石无核’作母本畸形苗率低,但是作父本杂交组合畸形萌发胚率高。

胚萌发培养基也是造成畸形胚萌发苗的重要原因。无核葡萄胚挽救过程中,大部分研究者主要探讨了胚萌发培养基附加成分对畸形苗的影响<sup>[2,11,24-25]</sup>。田莉莉<sup>[14]</sup>研究发现,MM4培养基中添加一定浓度的赤霉素和吲哚乙酸或腐胺后畸形率较高,分别达到了48.9%和41.8%,最高约为基本培养基的3倍。Ji等<sup>[17]</sup>研究发现,在MS培养基中添加一定浓度的赤霉素和吲哚乙酸后,一方面严重抑制了胚萌发,同时也促进了畸形苗的产生。李志谦<sup>[29]</sup>试验发现WP培养基铁盐换为ER铁盐时,接种的幼胚基本不能萌发,且发育都为白化苗。本试验主要集中研究了不同胚萌发的基本培养基对胚挽救畸形苗产生的影响,筛选了本课题组胚挽救使用较多的胚萌发基本培养基,进行了比较分析,结果发现无核葡萄胚挽救过程中MS培养基易诱导产生胚挽救畸形苗,畸形苗产生的效果从低到高的培养基依次为:改良MM3培养基、MM3培养基、ER培养基、MM4培养基、MS培养基。本试验进一步证明了课题组前期获得的改良MM3不仅提高了胚挽救成苗率,而且保证了胚挽救苗的质量。

无核葡萄胚挽救过程中产生各种畸形胚萌发苗应该是保存利用,而不是丢弃,因此保存好畸形萌发胚的材料,采取一定的方法尽可能促使胚挽救畸形胚萌发转变成正常葡萄试管苗,也是很有必要的,有助于提高无核葡萄胚挽救育种效率<sup>[3,15,18,24]</sup>。胚挽救产生的畸形苗要想转变成正常的葡萄试管苗,主要借助前人关于植物组织培养中畸形苗,即试管



畸形苗转变长成正常苗方法进行设计。首先调整培养基成分,适宜的培养基对于畸形胚萌发苗子转变成正常葡萄试管苗有一定的作用<sup>[19,20,37]</sup>。梁春莉<sup>[38]</sup>离体培养冬枣幼胚时发现当水解乳蛋白质量浓度为 $0.8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,效果最好,此时幼胚子叶较饱满展开,成苗率达36.7%。王壮伟等<sup>[15]</sup>对以无核葡萄为母本的9个杂交组合后代及无核品种实生后代进行了胚珠培养,研究了异常苗、畸形苗、白化苗的成苗情况,根据不同类型的畸形苗,确定了相应的成苗培养基。田莉莉<sup>[14]</sup>研究发现MM4培养基附加锌元素或硒元素之后,有效减少了畸形苗发生数量。Ji等<sup>[17]</sup>研究发现以 $2\text{MS}+6\text{-BA }0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{IBA }0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{香蕉泥 }500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为转化培养基,对单子叶畸形苗和子叶扭曲褶皱状畸形苗进行正常植株转化的成功率较高,胚萌发后4周是转化的适当时期。本试验调整了培养基中BA和IAA的浓度,发现 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ BA}+2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}$ 有助于胚挽救畸形苗转变成正常葡萄试管苗,转变率较高,达到24.6%。唐冬梅<sup>[18]</sup>研究了不同培养基对胚挽救畸形苗转化成正常苗的作用,发现 $\text{MS}+\text{BA }2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{IBA }0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 能较快诱导胚挽救畸形苗形成正常茎叶,诱导比率达到44.4%。本试验和唐冬梅的试验结果相比,转变率偏低,可能受不同杂交组合基因型的影响。本试验将无核葡萄胚挽救产生的畸形胚萌发苗分成了5类:白化苗、玻璃化苗、徒长苗、子叶扭曲无根苗和无生长点的有根苗。本试验主要根据3a(年)试验材料观察结合前人研究基础<sup>[14-15,18]</sup>进行的分类。田莉莉<sup>[14]</sup>和唐冬梅<sup>[18]</sup>根据试验观察,只是粗略地将胚萌发葡萄苗分为了3种情况:正常小苗;萌发后上胚轴仅出现1片子叶,或子叶呈扭曲褶皱状的畸形小苗,或分化过程中形成白化的畸形小苗;萌发胚虽可见上、下胚轴明显伸长,但萌发后形成的小苗生长势弱,在发育过程中很快衰亡。王壮伟等<sup>[15]</sup>将胚珠萌发成苗总结为6种情况:具有根、茎、叶的正常苗;具有根、茎,没有叶的异常苗;具有茎、叶而没有根的异常苗;只有茎的白化苗;只有白化叶的白化苗;胚轴粗壮扭曲,无生长点的畸形苗。本试验对这些分类与Ji等<sup>[17]</sup>报道的无核葡萄胚挽救畸形胚萌发苗的4种类型一致,Ji等<sup>[17]</sup>的分类主要包括单子叶畸形苗;无叶无根苗;子叶扭曲褶皱状畸形苗;分化过程中形成的白化苗;下胚轴形成短根,但没有子叶;上胚轴形成子叶,但

没有根;萌发后早期停止生长的小苗7种畸形苗类型。其他文献资料关于无核葡萄胚挽救畸形苗分类的报道比较少。

Debergh等<sup>[27]</sup>研究认为离体试管玻璃化苗主要是由于培养基的水势影响造成,这种畸形苗目前在植物离体培养中比较多见,封口膜的透气性差也容易造成玻璃化,这些玻璃化的材料多数不能发育成正常植株。Leshem<sup>[28]</sup>指出畸形苗的产生是由于离体培养过程中生长因子不平衡造成的。史文静等<sup>[30]</sup>研究发现无核葡萄胚挽救过程中延长胚珠离体暗培养时间显著增加了畸形胚比率。因此,无核葡萄胚挽救过程中畸形胚苗的产生一方面是由于父母本基因型本身和杂交组合造成的,另外一方面就是在胚珠离体培养过程中已经形成,直到萌发逐渐表现出来,因此早期就应该采取一定的技术措施预防畸形胚苗的产生<sup>[31-34]</sup>。预防措施主要包括:(1)要选择合适的父母本,设置合适的杂交组合;(2)采取适宜的培养条件。这个过程是以预防控制为主,也是获得较少畸形萌发胚的前提。其次可以调整培养方式、继代次数、培养条件等方面<sup>[14,17,31]</sup>。Valdez<sup>[36]</sup>的研究结果显示,切开胚珠获取胚,然后进行离体培养后,正常苗率达到80%,所以他认为接种方式可以降低畸形苗的发生比例。本试验研究发现畸形苗中的徒长苗采取及早切割转接,每隔14d转接1次,转变率较高,达到33.3%。前人主要是对无核葡萄胚挽救过程中畸形胚苗的产生原因及转变成正常葡萄试管苗的方法进行了研究和分析,但是对于最后成苗情况没有报道<sup>[15-18]</sup>,需要对转变正常的葡萄试管苗的驯化移栽开展进一步研究<sup>[39]</sup>。本试验对畸形萌发胚苗转变成的正常葡萄试管苗进行了驯化移栽,获得了一批无核葡萄杂交后代苗。本研究探讨了无核葡萄胚挽救过程中畸形苗的成因以及今后如何采取有效措施预防和调控胚挽救成苗过程,有助于获得更多的无核葡萄杂种材料正常苗子。

## 4 结 论

不同亲本基因型对无核葡萄胚挽救过程中畸形苗的产生影响不同,‘无核白’作母本胚挽救畸形苗比例较高,其次是‘赫什无核’;而母本相同,父本为‘塘尾’‘北醇’‘红宝石无核’‘无核白’‘红地球’的杂交组合胚挽救易产生畸形萌发胚。不同胚萌发基本培养基中,MS培养基易诱导产生胚挽救畸

形苗。WPM+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+IAA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+琼脂 6 g·L<sup>-1</sup>+蔗糖 20 g·L<sup>-1</sup>+活性炭 2.0 g·L<sup>-1</sup>培养基转接胚挽救畸形苗易转变成正常葡萄试管苗。每隔 14 d 继代转接胚挽救畸形苗也有助于正常葡萄试管苗的获得。5 种类型的胚挽救畸形苗中白化苗和玻璃化苗均未转变成正常苗。采取合适的驯化移栽操作步骤,能提高葡萄试管苗的移栽率。

### 参考文献 References:

- [1] CAIN D W, EMERSHAD R L, TARAIOLO R E. In ovule embryo culture and seedling development of seeded and seedless grape (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Vitis*, 1983, 22: 9-14.
- [2] 李桂荣,王跃进,唐冬梅,王西平,骆强伟. 无核白葡萄胚挽救育种技术研究[J]. 西北植物学报, 2001, 21(3): 432-436.  
LI Guirong, WANG Yuejin, TANG Dongmei, WANG Xiping, LUO Qiangwei. Research on the breeding technology of Thompson Seedless grape embryo rescue[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2001, 21(3): 432-436.
- [3] 潘学军. 无核抗病葡萄胚挽救技术体系的优化及新品种培育[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2005.  
PAN Xuejun. Innovating in the technique system of embryo rescue of stenospermocarpic grape and breeding new cultivars of both seedless and disease-resistance traits[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2005.
- [4] TIAN L L, WANG Y J. Seedless grape breeding for disease resistance by using embryo rescue[J]. *Vitis*, 2008, 47(1): 15-19.
- [5] 赵亚楠,骆强伟,王跃进. 利用胚挽救技术创制无核抗寒葡萄新种质[J]. 中国农业科学, 2018, 51(21): 4119-4130.  
ZHAO Yanan, LUO Qiangwei, WANG Yuejin. A new germplasm of seedless cold-resistant grape was created by embryo-saving technique[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(21): 4119-4130.
- [6] 李志瑛,骆强伟,王跃进. 无核葡萄胚挽救教育种与杂种后代分子标记辅助选择[J]. 果树学报, 2019, 36(1): 31-42.  
LI Zhiying, LUO Qiangwei, WANG Yuejin. Seedless grape embryo rescue breeding and hybrid progeny molecular marker-assisted selection[J]. *Journal of Fruit Science*, 2019, 36(1): 31-42.
- [7] RAMMING D W, EMERSHAD R L. In-ovule embryo culture of seeded and seedless *Vitis vinifera* L.[J]. *Hortscience*, 1982, 17: 487.
- [8] PEARSON H M. Parthenocarpy and seedlessness in *Vitis vinifera* L.[J]. *Science*, 1932, 76: 594.
- [9] LOOMIS N H, WEINBERGER J H. Inheritance studies of seedlessness in grape[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1979, 104: 181-184.
- [10] 陶建敏,陈长春,徐喜楼. 无核葡萄育种技术研究进展[J]. 果树学报, 1998, 15(1): 78-83.  
TAO Jianmin, CHEN Changchun, XU Xilou. Research progress of seedless grape breeding technology[J]. *Journal of Fruit Science*, 1998, 15(1): 78-83.
- [11] 张剑侠,牛茹萱. 无核葡萄胚挽救技术的研究现状与展望[J]. 园艺学报, 2013, 40(9): 1645-1655.  
ZHANG Jianxia, NIU Ruxuan. Research status and prospect of seedless grape embryo rescue technology[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, 40(9): 1645-1655.
- [12] 王跃进,江淑平,刘小宁,张剑侠. 假单性结实无核葡萄胚发育机理研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(10): 1987-1993.  
WANG Yuejin, JIANG Shuping, LIU Xiaoning, ZHANG Jianxia. Study on embryo abortion mechanism of pseudomonas seedless grape[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2007, 27(10): 1987-1993.
- [13] 刘崇怀. 无核葡萄品种的无核性来源分析[J]. 植物遗传资源学报, 2016, 4(1): 58-62.  
LIU Chonghuai. Analysis on seedless sources of seedless grape breeding[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2016, 4(1): 58-62.
- [14] 田莉莉. 抗病无核葡萄胚挽救教育种及种质创新[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2007.  
TIAN Lili. Breeding for the disease-resistant seedless grape novel varieties and innovating of new germplasm using embryo rescue[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2007.
- [15] 王壮伟,赵密珍,吴伟民,钱亚明,袁骥. 无核葡萄胚珠培养技术研究[J]. 江西农业学报, 2007, 19(2): 27-29.  
WANG Zhuangwei, ZHAO Mizhen, WU Weimin, QIAN Yaming, YUAN Ji. Study on techniques of ovule culture for seedless grape[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2007, 19(2): 27-29.
- [16] 唐冬梅. 无核葡萄杂交胚挽救新种质创建与技术完善[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2010.  
TANG Dongmei. Novel germplasm innovation of seedless grapes by embryo rescue and technique improvement[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2010.
- [17] JI W, LI Z Q, YAO W K. Abnormal seedlings emerged during embryo rescue and its remedy for seedless grape breeding[J]. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 2013, 31(4): 483-489.
- [18] 李桂荣. 无核葡萄胚胎发育的生理特性和胚挽救教育种技术的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2013.  
LI Guirong. Studies on physiological characteristics of embryo development and breeding techniques on embryo rescue in seedless grapes [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2013.
- [19] 洪勇,何永睿,梁丽,陈善春,张进仁. 柑桔畸形胚再生植株的研究[J]. 中国南方果树, 2000, 29(6): 13-14.  
HONG Yong, HE Yongrui, LIANG Li, CHEN Shanchun, ZHANG Jinren. Studies on citrus regenerated plants from deformed embryos[J]. *South China Fruits*, 2000, 29(6): 13-14.
- [20] 亓建飞,李付广,张朝军. 植物组织培养中畸形苗发生机理的研究进展[J]. 棉花学报, 2004, 16(4): 243-248.

- QI Jianfei, LI Fuguang, ZHANG Chaohong. Advances in research on the mechanism of malformation in plant tissue culture[J]. Cotton Science, 2004, 16(4): 243-248.
- [21] 任辉丽. 植物组织培养中畸形苗发生机理的研究进展[J]. 生物技术世界, 2014(10): 63.
- REN Huili. Advances in research on the mechanism of malformation in plant tissue culture[J]. Biotechnology World, 2014 (10): 63.
- [22] 孔冬梅, 沈海龙. 植物组织培养中畸形胚的发生和控制[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(5): 1018-1024.
- KONG Dongmei, SHEN Hailong. Occurrence and control of deformed embryos in plant tissue culture[J]. Plant Physiology Communications, 2008, 44(5): 1018-1024.
- [23] 唐冬梅, 王跃进, 赵荣华, 潘学军, 蔡军社, 张剑侠, 张朝红, 骆强伟. 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.
- TANG Dongmei, WANG Yuejin, ZHAO Ronghua, PAN Xuejun, CAI Junshe, ZHANG Jianxia, ZHANG Chaohong, LUO Qiangwei. Factors affecting embryo development in seedless grape embryo rescue[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42 (7): 2449-2457.
- [24] 王爱玲, 王跃进, 唐冬梅, 张剑侠, 张朝红. 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.
- WANG Ailing, WANG Yuejin, TANG Dongmei, ZHANG Jianxia, ZHANG Chaohong. Study on improving seedling rate of seedling from seedling of seedless grape embryo[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(20): 4238-4245.
- [25] LI G R, JI W, WANG G, ZHANG J X, WANG Y J. An improved embryo-rescue protocol for hybrid progeny from seedless *Vitis vinifera* grapes × wild Chinese *Vitis* species[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2014, 50(1): 110-120.
- [26] LI J, WANG X, WANG X, WANG Y. Embryo rescue technique and its applications for seedless breeding in grape[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2014, 120(3): 861-880.
- [27] DEBERGH P C, MAENE L J. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture[J]. Scientia Horticulturae, 1981, 14(4): 335-345.
- [28] LESHEM B. Growth of carnation meristems *in vitro*: Anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation[J]. Annals of Botany, 1983, 52: 413-415.
- [29] 李志谦. 葡萄底莱特×红宝石无核 F<sub>1</sub> 代优系无核性状改良与标记辅助选择[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- LI Zhiqian. Seedless traits improvement and marker assisted selection of F<sub>1</sub> of Delight×Ruby seedless[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2013.
- [30] 史文静, 骆强伟, 王跃进. 无核香味葡萄胚挽救育种研究[J]. 西北植物学报, 2018, 38(6): 983-993.
- SHI Wenjing, LUO Qiangwei, WANG Yuejin. Breeding grapevine varieties for seedlessness with flavor using embryo rescue [J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 2018, 38(6): 983-993.
- [31] 孟新法, 张利, 张潞生, 王素珍. 无核葡萄胚发育及早期离体培养的研究: III. 培养方式对离体胚发育影响[J]. 北京农业大学学报, 1992, 18(4): 393-395.
- MENG Xinfu, ZHANG Li, ZHANG Lusheng, WANG Suzhen. Studies on embryo development and early *in vitro* culture of seedless grape: III. Influence of culture method on *in vitro* embryo development[J]. Journal of China Agricultural University, 1992, 18(4): 393-395.
- [32] 徐海英, 张国军, 闫爱玲. 无核葡萄育种及杂交亲本的选择[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2001(3): 29-31.
- XU Haiying, ZHANG Guojun, YAN Ailing. Seedless grape breeding and selection of hybrid parents[J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2001(3): 29-31.
- [33] AMARAL A L, OLIVEIRA P R, CZERAINSKI A B, CAMARGO U A. Embryo growth stages on plant obtention from crosses between seedless grape parents[J]. Revista Brasileira De Fruticultura, 2001, 23: 647-651.
- [34] POMMER C V, RAMMING D W, EMERSHAD R L. Influence of grapes genotype, ripening season, seed trace size, and culture date on in ovule embryo development and plant formation[J]. Bragantia, 1995, 54: 237-249.
- [35] 纪薇. 无核葡萄胚挽救种质创新及畸形苗转化利用研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- JI Wei. Breeding for new germplasms of seedless grape using embryo rescue and remedy of abnormal seedlings[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2013.
- [36] VALDEZ J G. Immature embryo rescue of grapevine (*Vitis vinifera* L.) after an extended period of seed trace culture[J]. Vitis, 2005, 44(1): 17-23.
- [37] CHENGALRAYAN K, MHASKE V B, HAZRA S. High-frequency conversion of abnormal peanut somatic embryos[J]. Plant Cell Reports, 1997, 16(11): 783-786.
- [38] 梁春莉. 枣胚败育研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2005.
- LIANG Chunli. A study on embryo abortion of Chinese Jujube [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2005.
- [39] 王刚, 李桂荣, 王跃进, 张朝红. 无核葡萄胚挽救试管苗驯化移栽体系优化[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(8): 153-158.
- WANG Gang, LI Guirong, WANG Yuejin, ZHANG Chaohong. Optimization of seedling acclimation and transplanting system of seedlings saved from seedlings of seedless grape embryo[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2015, 43(8): 153-158.