果 树 学 报 2026,43(10):2894-2904
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20250742

不同杂交组合中无核葡萄胚挽救技术体系的优化

李鹏慧,李永洲*,贺亮亮,宋银花,章 鹏,刘肇先,周锦浩,刘三军*

(中国农业科学院郑州果树研究所,郑州 450009)

摘 要:【目的】构建适用于中晚熟无核葡萄的胚挽救技术体系,以解决假单性结实导致的胚败育、杂交后代获取困难的问题。**【方法】**以中葡18号和红宝石无核为母本,与玫瑰香、香妃、中葡18号和红宝石无核配置6个杂交组合,围绕胚挽救关键环节,系统比较不同杂交组合授粉后取样时间、培养基相态(固体与固-液双相)及外源氨基酸(脯氨酸和丝氨酸)类型与浓度对胚发育、萌发及成苗的影响;在NN培养基体系下开展胚珠离体培养,并对胚发育率、胚萌发率和成苗率进行统计分析。**【结果】**共接种胚珠8582个,正常发育胚1518个,平均胚发育率为17.69%。其中,中葡18号×玫瑰香的胚发育率最高,为26.44%。以中葡18号为母本的杂交组合在授粉后50 d时胚发育率最高,而以红宝石无核为母本的杂交组合在授粉后52 d时胚发育表现最优,提前或推迟取样均导致胚发育率明显下降。在相同母本背景下,有核父本的胚发育率普遍高于无核父本;三个杂交组合在固-液双相培养基中较固体培养基的胚发育率显著提高;果穗冷藏处理最高不超过7 d,随着冷藏时间延长,胚挽救效率下降;外源氨基酸添加可显著促进胚发育,5 mmol·L^{-1}脯氨酸和3 mmol·L^{-1}丝氨酸的处理效果最优,但二者混合使用未表现出协同增效作用。**【结论】**最佳采样时间、亲本基因型、培养基相态及适宜浓度氨基酸是影响无核葡萄胚挽救效率的关键因素。本研究建立了适用于中葡18号及红宝石无核等中晚熟无核葡萄品种的稳定胚挽救体系,可为无核葡萄育种提供重要技术支撑。

关键词:无核葡萄;胚挽救;取样时间;培养基;氨基酸

中图分类号:S663.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2026)10-2894-11

Optimization of the embryo rescue system for seedless grapes from different hybrid combinations

Li Penghui, Li Yongzhou*, He Liangliang, Song Yinhua, Zhang Peng, Liu Zhaoxian, Zhou Jinhao, Liu Sanjun*

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China)

Abstract:【Objective】Most seedless grape cultivars are stenospermocarpic: fertilization proceeds normally, but the embryos abort during early development, which severely limits the recovery rate of hybrid progeny when seedless grape cultivars are used as female parents. Embryo rescue is therefore essential for seedless grape breeding. However, its efficiency is strongly affected by multiple factors, including parental genotype, sampling time after pollination, medium composition and exogenous nutrient supply. This study aimed to establish an efficient and stable embryo rescue system for the mid-to-late ripening seedless grape cultivar Zhongpu 18, and clarify the key factors affecting embryo rescue efficiency across different hybrid combinations, so as to provide technical support for seedless grape germplasm innovation.【Methods】Six hybrid combinations were constructed by using Zhongpu 18 and Ruby Seedless as female parents, which were crossed with seeded and seedless male parents: the seeded male parents included Muscat Hamburg and Xiangfei, while the seedless male parents included Zhong-

收稿日期:2025-12-30 **接受日期:**2026-02-06

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(CAAS-ASTIP-ZFRI-02-202501);河南省科技攻关项目(242102111141);现代农业产业技术体系(CARS-30-15);中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2025-ZFRI)

作者简介:李鹏慧,女,在读硕士研究生,研究方向为葡萄育种。E-mail:l2427898159@163.com

***通信作者** Author for correspondence. E-mail:liyongzhou@caas.cn;E-mail:liusanjun@caas.cn

pu 18 and Ruby Seedless. Ovules were sampled at different days after pollination (DAP) and cultured *in vitro* on NN-based media. We systematically evaluated the effects of sampling time (46−54 DAP), medium culture type (solid medium versus solid-liquid two-phase medium), and exogenous amino acid supplementation (proline or serine at 1−5 mmol·L^{-1}) on embryo development. We recorded and statistically analyzed embryo development rate, embryo germination rate and seedling establishment rate to identify the optimal technical parameters.【Results】Embryo rescue efficiency varied significantly across different hybrid combinations, and was jointly regulated by maternal genotype, paternal genotype, sampling time after pollination, culture medium type, and exogenous amino acid supplementation. Across all six hybrid combinations, 8582 ovules were cultured, and 1518 developing embryos were obtained, with an average embryo development rate of 12.42%. In total, 534 seedlings were obtained, with an average seedling establishment rate of 50.09%, and the optimal sampling time differed significantly among maternal lines. For crosses with Zhongpu 18 as the female parent, embryo development peaked at 50 days after pollination (DAP), with the rate ranging from 18.18% to 21.43%. Sampling that was either too early or too late led to a marked reduction in the embryo development rate. In contrast, for hybrid combinations with Ruby Seedless as the female parent, the embryo development rate generally reached its maximum at 52 days after pollination, with the peak rate hitting 18.40%. Parental genotypes have a significant effect on the efficiency of embryo rescue. With the same maternal genetic background, hybrid combinations derived from seeded male parents consistently showed higher embryo development rates and seedling survival rates than those derived from seedless male parents. The phase state of the culture medium has a significant influence on embryo development. Compared with traditional solid media, solid-liquid dual-phase media improved embryo development rates in most hybrid combinations. Exogenous amino acid supplementation further improved embryo rescue efficiency, although responses varied among different hybrid combinations. The addition of 5 mmol·L^{-1} proline or 3 mmol·L^{-1} serine significantly promoted embryo development in multiple hybrids, with the Zhongpu 18 × Xiangfei hybrid combination reaching an embryo development rate of 25.00%. In contrast, simultaneous supplementation with proline and serine failed to produce additive or synergistic effects. In some cases, it even led to lower embryo development and germination rates compared with treatments using a single amino acid. These findings indicate that optimizing embryo rescue efficiency depends on selecting appropriate amino acid types and concentrations, rather than relying on mixed amino acid supplementation.【Conclusion】Sampling time after pollination, parental genotype, culture medium composition, and appropriate amino acid supplementation are all key factors determining the embryo rescue efficiency of seedless grapes. The optimized embryo rescue system established in this study is highly suitable for mid- to late-ripening seedless grape cultivars such as Zhongpu 18 and Ruby Seedless, which would provide a reliable technical basis for improving hybrid seedling recovery efficiency and accelerating the process of seedless grape breeding.

Key words: Seedless grape; Embryo rescue; Sampling time after pollination; Culture medium; Amino acids

葡萄（*Vitis vinifera* L.）是世界范围内重要的果树作物之一，具有悠久历史，在全球农业中占据重要地位[1-2]。同时，葡萄用途广泛，可用于鲜食、酿酒、果酱、果汁、果冻、葡萄籽提取物、葡萄干、醋和葡萄籽油等[3]。随着消费者对果品品质需求的不断增加，无核葡萄因食用便利和品质优良，已成为全球葡萄育种的重要方向。然而，大部分无核葡萄属于假单性结实型，其授粉受精正常，但胚在早期发育阶段发生败育，难以形成成熟种子，使得常规杂交育种难以获得F_1杂交后代。因此，胚挽救技术已成为无核葡

萄育种的核心方法[4-6]。

胚挽救成功率受多种因素影响。其中，以取样时间、亲本基因型、培养基成分及外源添加物最为关键[7-10]。研究表明，不同品种的胚败育时间存在显著差异。最佳胚珠采样时间通常位于胚珠发育至心形胚或子叶胚早期阶段，而提前或推迟采样均会降低胚发育率[11-12]。此外，母本和父本基因型均会影响合子胚潜能及发育速度，尤其是种子大小、果实成熟期和胚败育规律，均与胚挽救效率密切相关[13-16]。在培养基成分方面，椰汁、氨基酸及生长调节物质已证明可促进葡萄胚的发育和萌发。其中，氨基酸在调控胚细胞活性方面表现突出[17]，但不同类型及浓度的氨基酸在不同杂交组合中的响应差异仍不明确。

中葡18号和红宝石无核均为无核葡萄。其中，中葡18号为本单位自主选育的无核材料，具有较好的结实力和一定的抗逆性。近年来，其主要作为无核育种的基础材料参与杂交试验。尽管上述材料在育种研究中的价值逐渐凸显，但有关其在不同父本背景下的胚挽救反应差异仍缺乏系统研究。尤其是最佳采样时间、培养基相态以及外源氨基酸类型与浓度等关键条件尚未明确。

基于此，本研究以中葡18号与红宝石无核为母本，配置多个杂交组合，通过系统比较采样时间、培养基相态和外源氨基酸对胚发育与成苗率的影响，优化胚发育培养基以提升胚发育率和成苗率，构建中晚熟无核葡萄的胚挽救技术体系，为无核葡萄育种提供理论与关键技术支撑。

1 材料和方法

1.1 试验材料

2024年6月至2025年10月，在中国农业科学院郑州果树研究所及其新乡综合试验基地开展试验。供试材料为两个无核母本中葡18号与红宝石无核。其中，中葡18号为本单位自主培育的无核育种材料，兼具无核性和一定抗逆性。目前，主要用于杂交育种研究，尚未在生产上推广。父本材料为玫瑰香、香妃、红宝石无核和中葡18号。基于上述亲本，共配置6个杂交组合（表1）。所有亲本植株均在设施条件下栽培，树龄8~10 a（年），按照郑州果树研究所技术规范进行常规管理。

表1 杂交组合配置

Table 1 Hybrid combination settings

序号 Number	杂交组合 Cross combination	母本特性 Female parent characteristics	父本特性 Male parent characteristics
1	中葡18号×玫瑰香 Zhongpu No.18×Muscat Hamburg	无核、晚熟 Seedless，late-maturing	有核、中晚熟 Seeded，mid-late-maturing
2	中葡18号×红宝石无核 Zhongpu No.18×Ruby Seedless	无核、晚熟 Seedless，late-maturing	无核、晚熟 Seedless，late-maturing
3	中葡18号×香妃 Zhongpu No.18×Xiang Fei	无核、晚熟 Seedless，late-maturing	有核、早熟 Seeded，early-maturing
4	红宝石无核×中葡18号 Ruby Seedless×Zhongpu No.18	无核、晚熟 Seedless，late-maturing	无核、晚熟 Seedless，late-maturing
5	红宝石无核×香妃 Ruby Seedless×Xiangfei	无核、晚熟 Seedless，late-maturing	有核、早熟 Seeded，early-maturing
6	红宝石无核×玫瑰香 Ruby Seedless×Muscat Hamburg	无核、晚熟 Seedless，late-maturing	有核、中晚熟 Seeded，mid-late-maturing

1.2 田间杂交

在母本花序第一朵信使花开放时进行去雄处理。去雄操作于晴天07:00—10:00进行，使用灭菌镊子去除花帽使柱头完全暴露，去雄后立即套上透气纸袋并标记组合信息。去雄后2~3 d，当柱头分泌黏液时进行授粉，授粉时间为晴天07:00—09:00。授粉时将提前采集并自然干燥的父本花粉均匀撒布于柱头表面，授粉后再次套袋并记录授粉日期。每个杂交组合授粉花序数量不少于80穗，每次重复5株母本。

1.3 采样时间设置

采样时间以首次授粉日期计时。以中葡18号为母本的组合，采样时间设置为授粉后46、48、50和52 d；以红宝石无核为母本的组合，采样时间设置为授粉后48、50、52和54 d。采样作业均在07:00—09:00完成，采后立即放入冰盒运输至实验室，并于4 ℃下

短时保存（不超过12 h）。

1.4　果穗冷藏处理

为研究采后冷藏对胚珠活性的影响，在最适采样时间采集果穗后立即剔除病虫伤果，选取大小一致、无机械损伤的果穗用于试验。采集后，将果穗置于带有通气孔的聚乙烯袋中，袋口保持半封闭状态以兼顾透气性和保湿性，并置于（4±0.5）℃、相对湿度85%~90%的冷藏条件下保存。根据处理需求，将果穗分别冷藏0 d（不冷藏）、7 d、14 d和21 d。冷藏期间每日监测温湿度，若袋内出现水汽凝结则及时更换包装，以避免果粒因局部积水产生腐烂或霉变。各处理结束后立即取出果穗，在室温条件下回温约30 min，再按照流程进行果粒消毒和胚珠剥取。胚珠接种于NN培养基（Nitsch & Nitsch）：NN+500 mg·L^{-1} CH（casein hydrolysate，酸水解酪蛋白）+0.37 g·L^{-1} Gln（谷氨酰胺）+60 g·L^{-1} 蔗糖+2 g·L^{-1} AC（activated charcoal，活性炭）+7 g·L^{-1} AG（agar powder，琼脂）（pH 5.8~6.0）。随后，进入培养阶段，胚接种于WPM培养基：WPM+0.2 mg·L^{-1}6-BA+20 g·L^{-1}蔗糖+6 g·L^{-1}AG+1 g·L^{-1}AC（pH=5.8~5.9）。

1.5　果粒消毒与胚珠剥取

选取大小一致、外观正常的幼果进行消毒处理。首先将果粒置于流水下冲洗1~2 h，去除表面尘埃；随后以75%乙醇消毒30 s，用无菌水冲洗3次；将果粒置于5%次氯酸钠溶液中消毒15 min，并在超净工作台上用无菌水冲洗2~3次；将灭菌后的幼果放入无菌培养皿中，以灭菌刀具沿纵向切开，选取外形饱满且长度≥2 mm的胚珠进行剥离与培养。

1.6　胚珠发育培养

以NN+500 mg·L^{-1} CH +0.37g·L^{-1} Gln +60 g·L^{-1}蔗糖+2 g·L^{-1} AC+7 g·L^{-1} AG（pH=5.8~6.0）作为基础培养基。每个组培瓶接种20个胚珠，温度（25±2）℃，覆盖黑布进行遮光暗培养。固-液双相培养基为NN固体培养基加2~3 mL NN液体培养液覆盖表面（液相部分不加琼脂）。设置7个外源氨基酸处理（表2）：对照（N0，含200 mL·L^{-1}椰汁，CJ），以及分别添加1、3、5 mmol·L^{-1}脯氨酸（N1~N3）和1、3、5 mmol·L^{-1}丝氨酸（N4~N6）。

1.7　胚萌发培养

胚珠接种后，于（25±2）℃下暗培养8~9周。在无菌条件下，通过解剖镜剥取乳白色胚，用手术刀将裸胚挑出，接种于WPM培养基。每个组培瓶接种1个幼胚，培养室温度（25±2）℃，相对湿度100%，光照培养40 d后成苗。胚萌发成苗后，对胚挽救苗进行继代培养，每个株系继代2~3株（图1）。培养基为MS +0.6 mg·L^{-1}IBA +0.1 mg L^{-1} 6-BA +20 g·L^{-1}蔗糖+7 g·L^{-1} AG（pH=6.0）。

表2　不同胚发育培养基配制

Table 2　Preparation of different embryo development media

编号 Code	培养基类型 Basic medium	外源物质 Exogenous materials
N0	NN	200 mL·L^{-1} 椰汁 200 mL·L^{-1} CJ
N1	NN	200 mL·L^{-1} 椰汁 +1 mmol·L^{-1}脯氨酸 200 mL·L^{-1} CJ +1 mmol·L^{-1} Proline
N2	NN	200 mL·L^{-1} 椰汁 +3 mmol·L^{-1} 脯氨酸 200 mL·L^{-1} CJ +3 mmol·L^{-1} Proline
N3	NN	200 mL·L^{-1} 椰汁 +5 mmol·L^{-1} 脯氨酸 200 mL·L^{-1} CJ +5 mmol·L^{-1} Proline
N4	NN	200 mL·L^{-1} 椰汁+1 mmol·L^{-1} 丝氨酸 200 mL·L^{-1} CJ +1 mmol·L^{-1} Serine
N5	NN	200 mL·L^{-1} 椰汁+3 mmol·L^{-1} 丝氨酸 200 mL·L^{-1} CJ +3 mmol·L^{-1} Serine
N6	NN	200 mL·L^{-1}椰汁+5 mmol·L^{-1}丝氨酸 200 mL·L^{-1} CJ +5 mmol·L^{-1} Serine

1.8　指标测定与统计分析

胚发育率/%=发育胚数/接种胚珠数×100

幼苗率/%=正常幼苗数/接种胚珠数×100。

试验数据以均值±标准误（mean ± SE）表示，采用Tukey法多重比较（$P<0.05$），使用Microsoft Excel 2010软件进行统计分析。

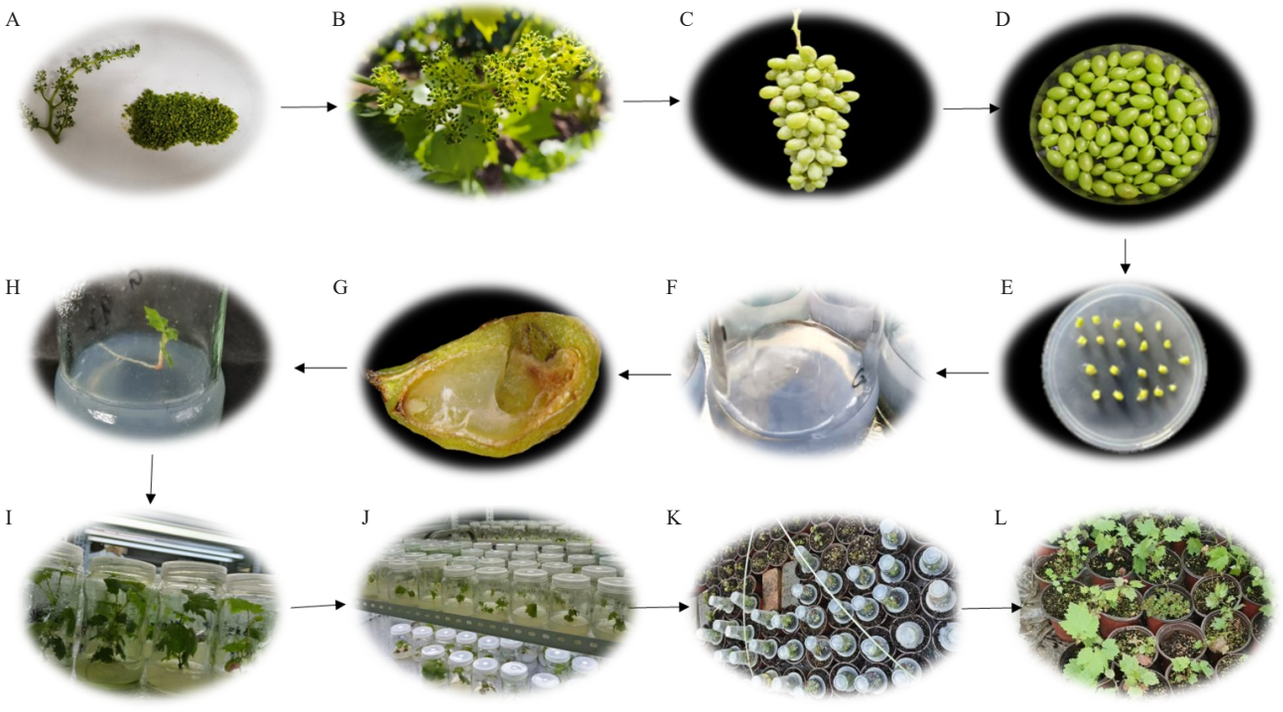
2　结果与分析

2.1　无核葡萄胚挽救结果分析

本试验共配置6个杂交组合，共接种胚珠8582个，正常发育胚1518个，平均胚发育率为17.69%，成苗534株，平均成苗率为50.09%。其中，中葡18号×玫瑰香胚发育率最高，为26.44%（表3）。

2.2　亲本基因型对胚挽救的影响

在相同父本的情况下，母本基因型对无核葡萄胚挽救效率影响较大（表3）。以玫瑰香为父本时，中葡18号×玫瑰香组合的胚发育率为26.44%，高于红宝石无核×玫瑰香组合（9.45%）；以香妃为父本时，中葡18号×香妃组合的胚发育率为14.06%，高于红宝石无核×香妃组合（10.47%）。在父本相同时，中葡18号是良好的母本材料。



A-B. 田间杂交(去雄 →授粉 → 套袋);C-D. 果粒采集与消毒;E. 胚珠(≥2 mm)暗培养;F-H. 胚萌发培养;I. 胚萌发成苗;J. 继代培养;K-L. 炼苗移栽。

A-B. Field hybridization (de-stemming→pollination→bagging); C-D. Fruit berry collection and disinfection; E. Ovule (≥2 mm) dark cultivation; F-H. Embryo germination culture; I. Embryo germination to seedlings; J. Subculture propagation; K-L. Hardening off and transplanting.

图 1 无核葡萄胚挽救流程

Fig. 1 Seedless Grape embryo rescue process

表 3 无核葡萄胚挽救结果

Table 3 Results of seedless grape embryo rescue

杂交组合 Cross combination	接种胚珠数 No.of ovules	发育胚数 No.of development embryos	胚发育率 Percentage of embryo developed/%	成苗数 No. of plantlets	成苗率 Percentage of plantlets/%
中葡18号×玫瑰香 Zhongpu No.18×Muscat Hamburg	3385	443	26.44	246	55.53
中葡18号×红宝石无核 Zhongpu No.18×Ruby Seedless	596	105	17.62	49	46.67
中葡18号×香妃 Zhongpu No.18×Xiangfei	825	116	14.06	62	53.45
红宝石无核×中葡18号 Ruby Seedless× Zhongpu No.18	551	90	16.33	38	42.22
红宝石无核×香妃 Ruby Seedless×Xiangfei	697	73	10.47	25	34.25
红宝石无核×玫瑰香 Ruby Seedless× Muscat Hamburg	2528	239	9.45	114	47.70
总计 Total	8582	1518	17.69	534	50.09

在相同母本的情况下,父本基因型同样对无核葡萄胚挽救效率影响较大(表3)。以中葡18号为母本的3个杂交组合中,中葡18号×玫瑰香胚发育率最高(26.44%),其次为中葡18号×红宝石无核(17.62%),中葡18号×香妃组合胚发育率最低(14.06%);以红宝石无核为母本时,红宝石无核×中葡18号组合的胚发育率最高(16.33%),其次为红宝石无核×香妃组合(10.47%),红宝石无核×玫瑰香组合最低,为9.45%。由此表明,不同父本基因型对胚挽救效率具有一定影响,其中以玫瑰香为父本与中葡18号杂

交时获得的胚发育率最高。

2.3　取样时间对胚挽救效果的影响

由表4可知，授粉后不同取样时间对各杂交组合胚发育率和成苗率的影响差异明显。以中葡18号为母本时，中葡18号×玫瑰香、中葡18号×红宝石无核均以授粉后50 d的胚发育率最高（分别为18.18%、21.43%），显著高于其他时间。以红宝石无核为母本时，不同杂交组合整体以授粉后52 d的胚发育率较高，其中红宝石无核×中葡18号胚发育率达18.40%，红宝石无核×香妃胚发育率达10.76%。结果表明，最佳取样时间因母本而异：中葡18号的最佳取样时间为授粉后50 d，红宝石无核为52 d。

2.4　培养基相态对胚挽救效果的影响

为探究培养基相态对胚挽救胚发育率和成苗率的影响，将中葡18号×玫瑰香、红宝石无核×玫瑰香、中葡18号×香妃三个杂交组合的胚珠分别接种于NN固体和NN固-液双相培养基上。结果（表5）表明，中葡18号×玫瑰香组合在固-液双相培养基中的

表4　取样时间对不同杂交组合胚挽救效果的影响

Table 4　Effects of sampling time after pollination on embryo rescue efficiency

杂交组合 Cross-combinations	授粉后时间 Day after Pollination/d	胚珠数 No. of ovules	发育胚数 No. of development embryos	胚发育率 Percentage of embryo developed/%	成苗数 No. of plantlets	成苗率 Percentage of plantlets/%
中葡18号×玫瑰香 Zhongpu No.18× Muscat Hamburg	46	167	22	13.17±0.20 c	11	73.33±1.40 c
	48	257	42	16.34±0.03 b	24	92.31±0.90 a
	50	396	72	18.18±0.51 a	35	85.37±3.23 b
	52	213	35	16.43±0.33 b	14	73.68±1.10 c
中葡18号×红宝石无核 Zhongpu No.18× Ruby Seedless	46	155	23	14.84±0.00 b	13	81.25±0.56 b
	48	176	23	13.07±0.18 b	13	86.67±0.71 a
	50	140	30	21.43±0.13 a	19	82.61±5.50 b
	52	125	17	13.60±0.49 b	4	57.14±0.59 c
红宝石无核×中葡18号 Ruby Seedless× Zhongpu No.18	48	88	4	4.55±0.13 c	0	0.00±0.00 d
	50	160	28	17.50±0.00 a	15	88.24±2.10 a
	52	125	23	18.40±0.08 a	12	80.00±1.03 b
	54	178	23	12.92±1.10 b	11	68.75±0.43 c
红宝石无核×香妃 Ruby Seedless×Xiangfei	48	160	11	6.88±0.57 c	4	50.00±0.13 c
	50	210	20	9.52±0.24 b	7	63.64±0.38 b
	52	251	27	10.76±0.01 a	13	81.25±3.10 a
	54	76	8	10.53±0.17 a	1	33.33±1.60 d

注：小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。下同。

Note: Small letters indicate significant differences ($P<0.05$). The same below.

表5　不同培养基相态对胚挽救效果的影响

Table 5　Effect of different medium phases on embryo rescue efficiency

杂交组合 Cross-combinations	培养基相态 Medium phases	胚珠数 No. of ovules	发育胚数 No. of development embryos	胚发育率 Percentage of embryo developed/%	成苗数 No. of plantlets	成苗率 Percentage of plantlets/%
中葡18号×玫瑰香 Zhongpu No.18× Muscat Hamburg	固相 Solid phase medium	280	29	10.36±2.01 b	19	65.52±3.33 b
	固-液双相 Double-phase medium	308	41	13.31±5.56 a	31	75.61±1.69 a
红宝石无核×玫瑰香 Ruby Seedless × Muscat Hamburg	固相 Solid phase medium	220	19	8.64±0.95 b	11	57.89±4.11 a
	固-液双相 Double-phase medium	220	33	15.00±1.43 a	17	51.52±1.01 b
中葡18号×香妃 Zhongpu No.18×Xiangfei	固相 Solid phase medium	92	17	18.48±0.01 a	9	52.94±3.12 b
	固-液双相 Double-phase medium	80	15	18.75±0.00 a	11	73.33±7.11 a

胚发育率（13.31%）显著高于固体培养基（10.36%）；红宝石无核×玫瑰香组合在固-液双相培养基中的胚发育率（15.00%），较固体培养基高约1倍（8.64%）；中葡18号×香妃组合在两种培养基中的胚发育率无显著差异，但双相体系下成苗率更高。综上所述，在不同培养基相态下，固-液双相体系普遍提高了胚发育率。

2.5 冷藏时间对胚挽救效果的影响

将果穗冷藏7、14、21 d，探究冷藏时间对胚挽救效果的影响。不同冷藏时间对胚挽救效果存在显著影响（表6）。中葡18号×玫瑰香与红宝石无核×玫瑰香的胚发育率在冷藏7 d时最高，分别为27.19%与12.70%；随后随着冷藏时间延长，胚发育率与成苗率迅速下降。在冷藏21 d时，两个组合的胚发育率分别降至2.19%和2.31%，表明在低温储存过程中果穗胚组织活性快速下降，不宜长时间冷藏。

表6 冷藏时间对胚挽救效果的影响

Table 6 Effects of cold storage duration on embryo rescue

杂交组合 Cross combinations	冷藏时间 Refrigeration time/d	胚珠数 No. of ovules	发育胚数 No. of development embryos	胚发育率 Percentage of embryo developed/%	成苗数 No. of plantlets	成苗率 Percentage of plantlets/%
中葡18号×玫瑰香 Zhongpu No.18×Muscat Hamburg	7	217	59	27.19±0.11 a	39	66.10±0.03 a
	14	238	9	3.78±0.13 b	2	22.22±1.60 b
	21	274	6	2.19±0.17 c	3	50.00±0.45 b
红宝石无核×玫瑰香 Ruby Seedless×Muscat Hamburg	7	315	40	12.70±0.29 a	29	72.50±1.33 a
	14	420	11	2.62±0.15 b	7	63.64±1.95 a
	21	390	9	2.31±0.09 b	4	44.44±0.18 b

2.6 外源氨基酸对胚挽救效果的影响

脯氨酸与丝氨酸对不同杂交组合的胚发育均具有促进作用（表7）。在红宝石无核×玫瑰香组合中，3 mmol · L^{-1} 丝氨酸处理（N5）的胚发育率最

表7 外源氨基酸对胚挽救效果的影响

Table 7 Effect of exogenous amino acids on embryo rescue

杂交组合 Cross combinations	培养基类型 Medium type	胚珠数 No. of ovules	发育胚数 No. of development embryos	胚发育率 Percentage of embryo developed/%	成苗数 No. of plantlets	成苗率 Percentage of plantlets/%
红宝石无核×玫瑰香 Ruby Seedless × Muscat Hamburg	N0	150	14	9.00±0.25 f	9	64.29±4.12 b
	N1	91	10	10.99±0.03 d	5	50.00±3.56 c
	N2	132	13	9.85±0.12 e	6	46.15±1.59 d
	N3	68	8	11.76±1.41 c	3	37.50±5.88 e
	N4	80	12	15.00±0.11 b	9	75.00±3.85 a
	N5	120	20	16.67±0.45 a	15	75.00±3.33 a
	N6	80	13	16.25±0.18 a	7	53.85±6.30 c
中葡18号×玫瑰香 Zhongpu No.18× Muscat Hamburg	N0	150	15	10.00±1.10 b	8	53.33±1.78 d
	N1	179	13	7.26±0.59 c	9	69.23±5.56 c
	N2	168	7	4.17±0.43 d	6	85.71±2.22 a
	N3	150	14	9.33±0.51 bc	10	71.43±4.12 b
	N4	150	11	7.33±1.35 c	8	72.73±0.00 b
	N5	170	26	15.29±0.55 a	13	50.00±7.35 e
	N6	171	12	7.02±0.94 c	7	58.33±6.67 d
中葡18号×香妃 Zhongpu No.18×Xiangfei	N0	150	9	6.00±0.00 f	4	44.44±4.82 d
	N1	60	7	11.67±2.31 d	3	42.86±7.74 d
	N2	89	17	19.10±2.86 b	11	64.71±2.22 b
	N3	60	15	25.00±1.51 a	11	73.33±1.95 a
	N4	109	10	9.17±0.07 e	6	60.00±1.51 c
	N5	105	10	9.52±0.18 e	4	40.00±4.01 d
	N6	80	11	13.75±0.62 c	3	27.27±2.32 e

高（16.67%）；在中葡18号×玫瑰香组合中，同样以3 mmol·L^{-1}丝氨酸处理的胚发育率最高（15.29%）；在中葡18号×香妃组合中，5 mmol·L^{-1}脯氨酸处理（N3）胚发育率最高（25.00%）。整体可知，5 mmol·L^{-1}脯氨酸和3 mmol·L^{-1}丝氨酸为最优浓度。

基于此结果，选择胚数最多的两个杂交组合红宝石无核×玫瑰香和中葡18号×玫瑰香，接种于NN+3 mmol·L^{-1}丝氨酸+5 mmol·L^{-1}脯氨酸的培养基上。结果显示，红宝石无核×玫瑰香胚发育率（10.74%）低于单独加3 mmol·L^{-1}丝氨酸的胚发育率；中葡18号×玫瑰香胚发育率（13.63%）低于单独加3 mmol·L^{-1}丝氨酸的胚发育率（表8），表明两者混合使用则无明显协同效应。

表8　外源氨基酸复配对胚挽救效果的影响

Table 8　Effect of exogenous amino acids compounding on embryo rescue

杂交组合 Cross combinations	培养基类型 Medium type	胚珠数 No. of ovules	发育胚数 No. of development embryos	胚发育率 Percentage of embryo developed/%	成苗数 No. of plantlets	成苗率 Percentage of plantlets/%
红宝石无核×玫瑰香 Ruby Seedless ×Muscat Hamburg	N3+N5	242	26	10.74±0.88 b	15	57.69±2.86 a
中葡18号×玫瑰香 Zhongpu No.18×Muscat Hamburg	N3+N5	110	15	13.63±0.58 a	7	46.67±0.93 b

3　讨　论

由于胚乳早衰和胚败育，无核葡萄天然种子形成率极低，这一特性长期限制了无核材料作为母本的杂交育种应用。胚挽救技术的建立为解决该问题提供了有效途径，使无核母本的杂交后代通过离体培养顺利完成胚发育，从而显著提高无核葡萄的育种效率。尽管该技术已广泛应用于突破无核母本胚败育的限制，但不同亲本组合在最佳采样时间、培养基条件和外源添加物需求方面仍存在明显差异，有必要在特定材料背景下构建适宜的胚挽救体系。本研究围绕中葡18号和红宝石无核等无核材料，对胚挽救关键因素进行系统分析，以期为无核葡萄育种提供更加精确的技术参数。

取样时间对胚挽救效率具有较大影响。已有研究发现，不同品种的最佳取样时间存在差异，一般认为最佳取样时间在胚发育程度较高，即将败育的时期。若采样时间过早，胚发育不完全，胚挽救效果不佳，种子萌发率较低；若采样过晚，则胚已发生败育，同样导致种子萌发率降低[18]。在胚发育至最佳状态时，对幼果采样，其胚挽救成功率最高。目前，胚珠发育高峰期的最佳时机主要采用DAP进行评估。李志瑛等[19]研究发现美丽无核和Fresno Seedless的胚败育时期为DAF 38 d，作为杂交母本时的最佳取样期分别为DAF 34~36 d和DAF 32~36 d；Giancaspro等[20]和Li等[21]研究发现以红宝石无核为母本时，最佳采样时间为花后55 d。本研究发现以中葡18号为母本的杂交组合，在首次授粉后50 d的胚挽救效率最高；以红宝石为母本的杂交组合，在首次授粉后52 d的胚挽救效率最高，这与前人结果存在差异。因此，不同研究人员基于DAP的最佳采样时间的差异受到年份、气候条件和栽培管理实践等因素的显著影响[6]。

合子胚的形成能力和发育程度受亲本基因型的严格控制，其中母本基因型显著影响胚挽救效果[22]。此外，胚挽救效率还与母本成熟期有关。早熟品种胚发生败育早，发育程度低，不适宜作为胚挽救母本，而晚熟品种胚挽救效率高[15,21]。近年来，学者多以胚挽救的成苗率作为评价种子败育型品种可挽救性的指标，成苗率低于5%的葡萄品种不适宜作为母本[7]。本研究中，以晚熟品种红宝石无核和中葡18号为母本的4个杂交组合的成苗率均高于5%，表明二者较适宜作为胚挽救母本，与前人研究结果一致[5,7]。同时，以红宝石无核和中葡18号为母本的4个杂交组合，胚发育率、萌发率与成苗率因父本不同而存在差异，表明父本基因型对胚挽救效果具有一定影响。李志瑛等[19]在以昆香无核为母本，北醇、红宝石无核、新郁分别为父本的杂交组合中，发现成苗率存在差异，表明父本材料的选择对成苗率具有一定影响。闫爱玲等[14]研究发现，父本有核与否影响杂交胚的发育，且有核父本能够提高胚发育率，进而提高胚挽救的成活率。在本研究中，以同一品种作为母本时，有核品种父本的胚挽救效率高于无核品种父本。因此，推测父本可能通过影响胚发育进程而影响发育胚数量，从而影响胚挽救效率。

在离体培养条件下，胚发育培养基为幼胚提供营养，是胚挽救成功的关键因素之一。培养基按相态可分为液体培养基、固体培养基、固-液双相培养基。Tian等[23]发现固-液双相培养基的培养效果显著优于固体和液体培养基；Ebadi等[24]在火焰无核胚珠2种形态的NN和ER培养基中发现，固-液双相培养基优于固体培养基。李桂荣等[8]在自然授粉的红宝石无核胚珠培养中同样发现，固-液双相培养基优于固体培养基。本研究利用NN固体和固-液双相培养基对三个杂交组合进行比较，研究发现3个杂交组合更适用于固-液双相培养基，与前人研究一致。但李志瑛等[19]研究发现，火焰无核×昆香无核和红宝石无核×克瑞森无核在固体培养基上成苗率较高，与本研究存在差异。同一类型培养基的不同物理形态对胚发育率产生差异化影响，可能是因为不同基因型胚的需氧量存在差异：需氧量较高的胚，在固体培养基上能更充分地与空气接触，发育状态更佳；而需氧量较低的胚，在固-液双相培养基体系中可与培养基形成更大的接触面积，能够更高效地摄取营养物质与外源激素，进而更利于自身发育。

外源氨基酸在葡萄胚珠离体发育中的作用已被多项研究证实。Emershad等[25]研究发现，半胱氨酸、天冬酰胺、丝氨酸和谷氨酰胺被证明能够促进无核白胚的发育、萌发和成苗，提示氨基酸在早期胚体代谢中具有重要调控作用。随后，其他研究进一步报道，苯丙氨酸等芳香族氨基酸在胚培养基中表现出促进合子胚形态建成和提高成苗率的作用，尤其在无核葡萄胚挽救体系中具有较高应用价值[26-28]。与此同时，王富强等[29]对无核葡萄中21种游离氨基酸的分析结果显示，其中11种与无核性状相关，表明氨基酸代谢可能参与无核胚形成与败育调控。此外，椰子乳汁作为传统胚培养添加物，含有称为“胚因子”的多种小分子营养物质，包括氨基酸、维生素及活性生长促进物质，在多项研究中被证明能够显著促进无核葡萄胚萌发及幼苗形成。在上述研究基础上，本研究进一步比较了单独添加椰汁与组合添加氨基酸的处理效果。结果显示，在保持椰汁恒定添加量的前提下，外源脯氨酸或丝氨酸的添加均能显著提高胚发育率，表明氨基酸与椰汁之间可能存在互补作用。5 mmol·L^{-1}脯氨酸和3 mmol·L^{-1}丝氨酸在多个组合中表现稳定，表明在葡萄胚培养体系中，适量氨基酸可在椰汁提供的基础营养上，进一步增强胚珠的氮源供应、渗透调节能力及细胞代谢活性。此外，本研究发现氨基酸+椰汁处理的胚发育率显著高于椰汁单独处理。结合椰汁自身含有一定量氨基酸的特征，推测两类氮源可能通过协同调节氮代谢与蛋白质合成，共同促进胚发育。然而，混合氨基酸之间并未表现出叠加效应，提示不同氨基酸之间可能存在代谢互作，最适浓度需根据材料类型分别优化。

已有研究表明，果穗采后冷藏处理能够加速胚珠活性衰退，从而降低胚挽救成功率[30]。无核葡萄胚珠对采后贮藏极为敏感[31]，冷藏超过5~7 d即会导致胚乳迅速退化、胚细胞失水收缩，使其在离体培养中的发育潜力显著下降。此外，国内其他研究报道，无核品种的胚珠在低温条件下对渗透胁迫和氧化损伤更为敏感，冷藏时间每延长1 d，胚珠存活率便呈递降趋势，表现出明显的时间依赖性。本研究结果同样表明，冷藏时间对胚挽救效果具有显著抑制作用，但不同组合间的下降幅度存在差异。其中，中葡18号×玫瑰香和红宝石无核×玫瑰香组合均在冷藏7 d时获得最高胚发育率，而超过7 d后胚发育率迅速下降，在14~21 d时降至最低水平。与前人研究相比，本研究中冷藏7 d时仍可获得较高胚发育率，可能与材料成熟度较高、果穗含水量较适宜或采后处理得当等因素有关，但整体趋势仍与已有结论一致，即无核葡萄胚珠在低温条件下易发生快速衰退。

4 结 论

本研究通过比较不同亲本组合、采样时间、培养基相态及外源氨基酸对胚发育和成苗率的影响，构建了适用于中葡18号和红宝石无核等无核葡萄的高效胚挽救体系。中葡18号是较为理想的母本材料，最佳取样时间受母本基因型显著影响；中葡18号适宜在授粉后50 d采样，而红宝石无核适宜在52 d采样；父本基因型同样影响胚挽救效果，有核父本显著提高胚发育率和成苗率。固-液双相体系普遍促进胚发育与成苗，优于传统固体培养基。果穗冷藏处理不宜过久，否则会降低胚挽救效率。5 mmol·L^{-1}脯氨酸和3 mmol·L^{-1}丝氨酸对胚发育的促进效果最显著，但两者混合使用无协同增效作用。本研究构建的技术体系为提高无核葡萄胚挽救效率提供了可实践的方法，对后续无核葡萄育种材料创制具有重要应用价值。

参考文献 References：

[1] Li J，Wang X H，Wang X P，Wang Y J. Embryo rescue technique and its applications for seedless breeding in grape[J]. Plant Cell，Tissue and Organ Culture (PCTOC)，2015，120(3)：861-880.

[2] Atak A. *Vitis* species for stress tolerance/resistance[J]. Genetic Resources and Crop Evolution，2025，72(2)：2425-2444.

[3] Wang X，Liu Z J，Zhang F，Xiao H，Cao S，Xue H，Liu W W，Su Y，Liu Z Y，Zhong H X，Zhang F C，Ahmad B，Long Q M，Zhang Y C，Liu Y T，Gan Y，Hou T，Jin Z X，Wu X Y，Liu G T，Wang Y W，Peng Y L，Zhou Y F. Integrative genomics reveals the polygenic basis of seedlessness in grapevine[J]. Current Biology，2024，34(16)：3763-3777.

[4] 陈豆豆，贺亮亮，章鹏，关利平，宋银花，刘三军 . 无核品种中葡萄 18 号胚挽救技术体系的建立及其杂交后代早期选择[J]. 果树学报，2021，38(12)：2223-2235.
Chen Doudou，He Liangliang，Zhang Peng，Guan Liping，Song Yinhua，Liu Sanjun. Construction of embryo rescue technology system for seedless grape cultivar Zhongputao No. 18 and early selection of hybrid offspring[J]. Journal of Fruit Science，2021，38(12)：2223-2235.

[5] 陈豆豆 .‘中葡萄 18 号’胚挽救体系构建及无核基因分子标记应用[D]. 北京：中国农业科学院，2021.
Chen Doudou. Construction of embryo rescue system of ‘Zhongputao No. 18’ and application of molecular markers linked to seedless genes in grapevine[D]. Beijing：Chinese Academy of Agricultural Sciences，2021.

[6] 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. The present situation and prospect of embryo rescue technique research in seedless grape breeding[J]. Acta Horticulturae Sinica，2013，40(9)：1645-1655.

[7] 朱佩佩，罗燚佳，向雯，张明磊，张剑侠 . 抗寒无核葡萄杂种胚挽救及分子标记辅助选择[J]. 中国农业科学，2021，54(6)：1218-1228.
Zhu Peipei，Luo Yijia，Xiang Wen，Zhang Minglei，Zhang Jianxia. Rescue and molecular marker assisted-selection of the cold-resistant seedless grape hybrid embryo[J]. Scientia Agricultura Sinica，2021，54(6)：1218-1228.

[8] 李桂荣，全冉，程珊珊，侯小进，樊秀彩，扈惠灵 . 无核葡萄离体胚珠发育影响因子及其生理变化[J]. 中国农业科学，2020，53(22)：4646-4657.
Li Guirong，Quan Ran，Cheng Shanshan，Hou Xiaojin，Fan Xiucai，Hu Huiling. The influencing factors of *in-vitro* ovule development in seedless grape and its physiological changes[J]. Scientia Agricultura Sinica，2020，53(22)：4646-4657.

[9] 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. Research on improvement of seedling rate in embryo rescue of seedless grapes[J]. Scientia Agricultura Sinica，2010，43(20)：4238-4245.

[10] 贾姗姗，骆强伟，李莎莎，王跃进 . 葡萄胚挽救技术优化及无核和玫瑰香味新种质创制[J]. 中国农业科学，2020，53(16)：3344-3355.
Jia Shanshan，Luo Qiangwei，Li Shasha，Wang Yuejin. Optimization of embryo rescue technique and production of potential seedless grape germplasm with rosy aroma[J]. Scientia Agricultura Sinica，2020，53(16)：3344-3355.

[11] 耿向娱 . 葡萄特异种质创制与繁殖技术研究[D]. 杨凌：西北农林科技大学，2022.
Geng Xiangyu. Study on creation and propagation technology of grape specific germplasm resources[D]. Yangling：Northwest A & F University，2022.

[12] 原筱简 . 无核葡萄种质材料创制研究[D]. 杨凌：西北农林科技大学，2023.
Yuan Xiaojian. Study on the creation of seedless grape germplasm materials[D]. Yangling：Northwest A & F University，2023.

[13] 王栋，岳妙琦，包敏，王琦俐，王西平 . 利用胚挽救技术创制无核葡萄新材料[J]. 果树学报，2024，41(9)：1705-1715.
Wang Dong，Yue Miaoqi，Bao Min，Wang Qili，Wang Xiping. Creation of new seedless grape materials *via* embryo rescue[J]. Journal of Fruit Science，2024，41(9)：1705-1715.

[14] 闫爱玲，王慧玲，孙磊，张国军，王晓玥，任建成，徐海英 . 父本对无核葡萄‘Afrodita’胚培养的影响研究[J]. 中国果树，2021(11)：15-19.
Yan Ailing，Wang Huiling，Sun Lei，Zhang Guojun，Wang Xiaoyue，Ren Jiancheng，Xu Haiying. Effect of paternal parent on embryo culture of seedless grape ‘Afrodita’[J]. China Fruits，2021(11)：15-19.

[15] 徐可遥 . 利用胚挽救技术选育香味无核葡萄新种质[D]. 杨凌：西北农林科技大学，2016.
Xu Keyao. Development of novel muscat seedless grapevine germplasm by embryo rescue[D]. Yangling：Northwest A & F University，2016.

[16] Gray D J，Mortensen J A，Benton C，Durham R E，Moore G A. Ovule culture to obtain progeny from hybrid seedless bunch grapes[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science，1990，115(6)：1019-1024.

[17] Wang F Q，Bian L，Xu G G，Cheng M J，Xu T F，Liu G T，Xu Y. Scientific optimization and application of embryo development medium for seedless grape embryo rescue[J]. Scientia Horticulturae，2025，346：114176.

[18] 庞富强，马小河，张晓萍，李戌彦，纪薇 . 假单性结实型无核葡萄胚挽救影响因子研究[J]. 果树学报，2021，38(10)：1699-1707.
Pang Fuqiang，Ma Xiaohe，Zhang Xiaoping，Li Xuyan，Ji Wei. A

study on the factors influencing rescue success of the embryo in stenopermocarpic grape[J]. Journal of Fruit Science，2021，38(10)：1699-1707.

[19] 李志瑛，骆强伟，王跃进 . 无核葡萄胚挽救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. Breeding seedless grapevine *via* embryo rescue and marker-assisted selection in hybrid progenies[J]. Journal of Fruit Science，2019，36(1)：31-42.

[20] Giancaspro A，Mazzeo A，Carlomagno A，Gadaleta A，Somma S，Ferrara G. Optimization of an *in vitro* embryo rescue protocol for breeding seedless table grapes (*Vitis vinifera* L.) in Italy[J]. Horticulturae，2022，8(2)：121.

[21] Li Z Q，Li T M，Wang Y J，Xu Y. Breeding new seedless grapes using *in ovulo* embryo rescue and marker-assisted selection[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant，2015，51(3)：241-248.

[22] Li T M，Li Z Q，Yin X，Guo Y R，Wang Y J，Xu Y. Improved *in vitro Vitis vinifera* L. embryo development of F_1 progeny of ‘Delight’ × ‘Ruby seedless’ using putrescine and marker-assisted selection[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant，2018，54(3)：291-301.

[23] Tian L L，Wang Y J，Niu L，Tang D M. Breeding of disease-resistant seedless grapes using Chinese wild *Vitis* spp.[J]. Scientia Horticulturae，2008，117(2)：136-141.

[24] Ebadi A，Aalifar M，Farajpour M，Moghaddam M R F. Investigating the most effective factors in the embryo rescue technique for use with ‘Flame Seedless’ grapevine (*Vitis vinifera*)[J]. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology，2016，91(5)：441-447.

[25] Emershad R L，Ramming D W. *In-ovulo* embryo culture of *Vitis vinifera* L. cv. ‘Thompson Seedless’[J]. American Journal of Botany，1984，71(6)：873-877.

[26] 刘琦瑛 . 无核葡萄胚挽救影响因素研究与分子标记辅助选择[D]. 杨凌：西北农林科技大学，2022.
Liu Qiying. Study on influencing factors of embryo rescue of seedless grape and marker assisted selection[D]. Yangling：Northwest A & F University，2022.

[27] Emershad R. L，朱林 . 无核白葡萄带胚珠的胚培养[J]. 国外农学(果树)，1986(1)：16-18.
Emershad R. L，Zhu Lin.Embryo culture of seedless white grapes with embryo sacs[J]. Foreign Agronomy (Fruit Trees)，1986(1)：16-18.

[28] 玉赛赛，李莎莎，骆强伟，徐炎，王跃进 . 胚挽救创造无核抗寒葡萄新种质[J]. 北方园艺，2021(22)：29-37.
Yu Saisai，Li Shasha，Luo Qiangwei，Xu Yan，Wang Yuejin. Embryo rescue technique create new seedless，cold-resistant grapevines germplasm[J]. Northern Horticulture，2021(22)：29-37.

[29] 王富强 . 葡萄胚挽救技术创新及无核香味新种质创制[D]. 杨凌：西北农林科技大学，2025.
Wang Fuqiang. Innovation of grape embryo rescue technology and development of novel seedless aromatic germplasm[D]. Yangling：Northwest A & F University，2025.

[30] Kavitha P S. Embryo culture studies in papaya[D]. Coimbatore：Tamil Nadu Agricultural University，1999.

[31] 魏晓慧，乔月莲，杨丽丽，王莉，师校欣，杜国强 . 利用胚挽救获得葡萄三倍体植株[J]. 分子植物育种，2020，18(7)：2303-2308.
Wei Xiaohui，Qiao Yuelian，Yang Lili，Wang Li，Shi Xiaoxin，Du Guoqiang. Obtaining triploid plants *via* embryo rescue in grapes[J]. Molecular Plant Breeding，2020，18(7)：2303-2308.