

王庆莲, 吴伟民, 赵密珍, 等. 无核葡萄及其杂交组合胚挽救技术[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1413-1418.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.06.034

无核葡萄及其杂交组合胚挽救技术

王庆莲, 吴伟民, 赵密珍, 钱亚明, 夏瑾

(江苏省农业科学院园艺研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 为研究无核葡萄及其杂交组合胚挽救技术的影响因素, 以无核葡萄莫利莎无核、希姆劳特及其正反交杂交组合为试验材料, 分析了培养基种类、6-BA 浓度、胚珠处理方式和取样时期对无核葡萄胚珠发育和萌发的影响。结果显示, 莫利莎无核葡萄胚挽救种胚萌发的最佳培养基及其组分为 WPM 培养基+6-BA 0.2 mg/L + 水解酪蛋白质 50.0 mg/L + 活性炭 3.0 g/L + 琼脂 6.5 g/L + 蔗糖 20.0 g/L; 不同的胚珠处理均可以提高其萌发率, 其中以横切处理为最佳; 不同品种及其不同杂交组合胚挽救的最佳取样时期不同; 母本对胚珠的萌发起着关键作用。表明在无核葡萄胚挽救技术育种实践中, 应当根据不同的亲本及其杂交组合进行不同的优化研究。

关键词: 无核葡萄; 胚挽救; 培养基; 激素; 萌发

中图分类号: S663.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)06-1413-06

Embryo rescue techniques for seedless grapes and reciprocal cross combinations

WANG Qing-lian, WU Wei-min, ZHAO Mi-zhen, QIAN Ya-ming, XIA Jin

(Institute of Horticulture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China)

Abstract: To figure out the factors influencing embryo rescue in seedless grapes and their reciprocal cross combinations, the seedless grapes Melissa seedless, Himrod and their reciprocally crossed progenies were used as test materials to study the effects of basal medium varieties, 6-BA concentrations, ovule treating modes and sampling dates on the embryo development and germination. The results showed that the medium favoring the germination of ovules consisted of WPM, 6-BA 0.2 mg/L, LH 50.0 mg/L, activated carbon 3.0 g/L, agar 6.5 g/L, and sucrose 20.0 g/L. All the ovule treating modes improved their germination, among which, crosscut was the best. The best sampling dates for the embryo rescue varied among seedless grapes and their reciprocally crossed progenies. The female parent was the key to embryo germination. In the practice of embryo rescue, culture medium variety, 6-BA concentration, ovule treating mode and sampling date should be combined differently according to the grape parents and their cross combinations.

Key words: seedless grape; embryo rescue; medium; hormone; germination

收稿日期: 2015-06-03

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20131331); 现代农业产业技术体系专项基金项目(CARS-30)

作者简介: 王庆莲(1979-), 女, 山东莱芜人, 博士, 副研究员, 主要从事浆果类作物资源与遗传育种研究。(Tel) 025-84390219; (E-mail) wang_qinglian@163.com

通讯作者: 吴伟民, (E-mail) 5wm@163.com

无核葡萄无论用于鲜食、制干或制罐, 深受世界消费者的青睐, 有着广阔的市场前景, 因此培育大粒、无核葡萄是当今世界葡萄育种的重要目标之一。绝大多数的无核葡萄品种类型属于种子败育型, 即受精卵形成的合子胚在发育过程中发生败育, 以致于在果实成熟时只留下残迹, 导致以无核品种作母本则很难得到可发育成苗的种子^[1]。20 世纪 80 年

代以前的无核品种育种是以有核品种作母本、无核品种作父本的有性杂交获得,其后代的无核几率很低,只有 0~15.9%^[2-5],这严重地影响了无核葡萄育种的效率;80 年代以后随着生物技术的发展,1982 年 Ramming 等改变了传统的育种模式,首次使用胚珠培养技术获得了两株无核葡萄苗,创立了无核葡萄胚挽救技术^[6]。1990 年 Ramming 等通过研究再次发现无核葡萄胚珠培养获得的杂种植株中有 82% 表现为无核性状^[7]。之后,国内外研究者相继利用胚挽救技术创建了大量的无核葡萄新种质^[8-21],使得无核葡萄育种中以无核品种作母本的杂交成为现实,极大地提高了后代的无核比例,而且比常规传统杂交技术节省了时间,提高了育种的效率,因此胚挽救技术可以被认为是无核葡萄育种的最有效方式之一^[22-23]。但由于受基因型和离体培养条件的影响,葡萄幼胚离体发育和萌发成苗率低仍然是制约无核葡萄育种的关键限制因素。

本研究在前人研究的基础上,采用正反交试验设计,进一步研究无核葡萄品种及其杂交组合胚挽救过程中胚珠培养成苗的亲本亲和性,探索适宜胚珠萌发的培养基成分与激素浓度、接种时期和胚珠处理方式,建立适用于这些亲本组合的高效无核葡萄胚挽救技术体系,为今后的无核葡萄育种提供指导。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验材料来源于江苏省农业科学院园艺研究所葡萄试验园内正常的葡萄植株,常规管理。

以自然授粉的无核葡萄莫利莎无核和希姆劳特及其去雄授粉的正反交杂交组合莫利莎无核×希姆劳特、希姆劳特×莫利莎无核为试验材料,分别采集授粉后 4 周、5 周、6 周、7 周、8 周和 9 周的葡萄果穗,置于 4℃ 冰箱保存备用。于 2011 年 5 月至 2012 年 12 月在江苏省农业科学院园艺研究所生物实验室进行试验。

1.2 方法

采集授粉后不同周数的葡萄果穗,将其果粒用清水冲洗数次,然后在无菌超净工作台上用 75% 酒精消毒 30~60 s,再用 15% 次氯酸钠溶液消毒 15~20 min,最后用无菌水冲洗 3 次。将消毒后的果粒切开,取出胚珠,接种于江苏省农业科学院园艺研究

所浆果研究室已经建立的 pH 5.8 的胚珠发育培养基(Nitsch 培养基+IAA 2.0 mg/L+GA₃ 0.4 mg/L+水解酪蛋白质 100.0 mg/L+活性炭 2.0 g/L+琼脂 6.5 g/L+蔗糖 20.0 g/L)^[24]。在温度为(25±1)℃条件下进行暗培养。培养 60 d 后统计胚珠发育率,将绿色胚珠作为发育胚珠统计。计算公式为:胚珠发育率=(绿色胚珠数量/接种胚珠数量)×100%。

1.2.1 培养基种类和 6-BA 激素浓度对胚珠萌发的影响 以自然授粉后 7 周的莫利莎无核葡萄果粒胚珠为试验材料,将胚珠发育培养基上暗培养 60 d 的绿色胚珠进行横切处理后转入不同的胚珠萌发培养基中进行萌发培养。

胚珠萌发培养的基本培养基种类选用 1/2 MS、Nitsch、B5 和 WPM,植物生长激素 6-BA 浓度梯度为 0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.4 mg/L、0.5 mg/L 和 1.0 mg/L,在附加 50.0 mg/L 水解酪蛋白质、3.0 g/L 活性炭、6.5 g/L 琼脂和 20.0 g/L 蔗糖的培养基(pH 5.8)上进行萌发培养。培养条件为温度(25±1)℃、日照时数 15 h、光照度 2 000 lx,30 d 后统计胚珠萌发率。计算公式为:胚珠萌发率=(萌发胚珠数量/接种胚珠数量)×100%。每处理接种 3~6 瓶,每瓶接种 20~25 枚胚珠。

1.2.2 胚珠处理方式对其萌发的影响 以自然授粉后 7 周的莫利莎无核葡萄果粒胚珠为试验材料,选择胚珠发育培养基上暗培养 60 d 的绿色胚珠,采用切喙、横切、剥取裸胚等处理方式,转入 1.2.1 方法筛选出的胚珠萌发培养基(WPM 培养基+6-BA 0.2 mg/L+水解酪蛋白质 50.0 mg/L+活性炭 3.0 g/L+琼脂 6.5 g/L+蔗糖 20.0 g/L)上进行萌发培养,培养条件为温度(25±1)℃、日照时数 15 h、光照度 2 000 lx,30 d 后统计胚珠萌发率。计算公式为:胚珠萌发率=(萌发胚珠数量/接种处理胚珠数量)×100%。每处理接种 3~6 瓶,每瓶接种 20~25 枚胚珠。

1.2.3 取样时期对胚珠发育和萌发的影响 将不同取样时期(授粉后 4 周、5 周、6 周、7 周、8 周和 9 周)的无核葡萄莫利莎无核和希姆劳特及其正反交杂交组合的胚珠发育培养 60 d 的绿色胚珠横切处理后转接到 1.2.1 方法筛选出的胚珠萌发培养基(WPM 培养基+6-BA 0.2 mg/L+水解酪蛋白 50.0 mg/L+活性炭 3.0 g/L+琼脂 6.5 g/L+蔗糖 20.0 g/L)上进行萌发培养。培养条件为温度(25±1)

℃、日照时数 15 h、光照度2 000 lx,30 d 后统计胚珠萌发率。计算公式为:胚珠萌发率=(萌发胚珠数量/接种胚珠数量)×100%。每处理接种 3~6 瓶,每瓶接种 20~25 枚胚珠。

1.3 数据分析

试验数据采用 Microsoft office excel 2007 和 SPSS 11.0 软件进行统计及分析。

2 结果与分析

2.1 培养基种类和 6-BA 浓度对胚珠萌发的影响

培养基种类和植物生长激素 6-BA 浓度对授粉后 7 周的莫利莎无核葡萄胚珠萌发的影响结果见表 1。由表 1 可以看出,不同的培养基种类对莫利莎无核葡萄胚珠萌发的影响不同,其中 WPM 基本培养基的平均萌发率最高,为 18.63%,分别是 1/2 MS、B5 和 Nitsch 基本培养基平均萌发率的 3.79 倍、2.62 倍和 1.66 倍,这说明 WPM 培养基是适合莫利莎无核葡萄胚珠萌发的最佳培养基类型。

由植物生长激素 6-BA 浓度对莫利莎无核胚珠萌发的影响(表 1)可以看出,在以 1/2 MS 为基本培养基的胚挽救试验中以添加 0.5 mol/L 6-BA 的胚珠萌发率最高,为 9.28%;在以 B5 和 WPM 为基本培养基的胚挽救试验中均以添加 0.2 mol/L 6-BA 的胚珠萌发率最高,分别为 11.21% 和 32.99%;而在以 Nitsch 为基本培养基的试验中 0.4 mol/L 6-BA 的胚珠萌发率为最高,为 18.56%。同时,还可以看出,以 WPM 为基本培养基且添加 0.2 mol/L 6-BA 的胚珠萌发率均高于以 1/2 MS、Nitsch 和 B5 基本培养基添加不同 6-BA 浓度的胚珠萌发率。

综上所述,选用 WPM 为基本培养基、添加 0.2 mol/L 6-BA 并附有 50.0 mg/L 水解酪蛋白质、3.0 g/L 活性炭、6.5 g/L 琼脂和 20.0 g/L 蔗糖是莫利莎无核葡萄胚珠萌发的最佳培养基组分。

2.2 胚珠处理方式对胚珠萌发的影响

不同胚珠处理方式对授粉后 7 周的莫利莎无核葡萄胚珠萌发的影响结果见表 2。由表 2 可以看出,与发育胚珠直接转接相比,不同的胚珠处理方式均可以提高莫利莎无核葡萄胚珠的萌发,其中剥胚和横切处理的萌发率最高,分别比直接转接的胚珠萌发率显著提高了 4.03 倍和 5.17 倍;其次是纵切处理的萌发率,比直接转接的显著提高了 1.55 倍;

切喙处理虽可以提高胚珠的萌发率,但是与直接转接的胚珠萌发率相比差异不显著。

表 1 培养基种类和 6-BA 浓度对胚珠萌发的影响

Tbale 1 Effect of culture medium varieties and 6-BA concentrations on the ovule germination

| 基本培养基种类 | 6-BA 浓度 (mg/L) | 接种数量 (枚) | 萌发数量 (枚) | 萌发率 (%) |
|---------|----------------|----------|----------|---------|
| 1/2 MS | 0.1 | 88 | 1 | 1.14 |
| | 0.2 | 101 | 4 | 3.96 |
| | 0.4 | 99 | 8 | 8.08 |
| | 0.5 | 97 | 9 | 9.28 |
| | 1.0 | 103 | 2 | 1.94 |
| B5 | 0.1 | 92 | 4 | 4.35 |
| | 0.2 | 107 | 12 | 11.21 |
| | 0.4 | 108 | 10 | 9.26 |
| | 0.5 | 98 | 5 | 5.10 |
| | 1.0 | 87 | 4 | 4.60 |
| Nitsch | 0.1 | 94 | 6 | 6.38 |
| | 0.2 | 102 | 12 | 11.76 |
| | 0.4 | 97 | 18 | 18.56 |
| | 0.5 | 103 | 15 | 14.56 |
| | 1.0 | 95 | 4 | 4.21 |
| WPM | 0.1 | 96 | 15 | 15.63 |
| | 0.2 | 97 | 32 | 32.99 |
| | 0.4 | 104 | 23 | 22.12 |
| | 0.5 | 86 | 12 | 13.95 |
| | 1.0 | 100 | 8 | 8.00 |

表 2 胚珠处理方式对胚珠萌发的影响

Tbale 2 Effect of different ovule treatments on ovule germination

| 指标 | 直接转接 | 横切 | 纵切 | 切喙 | 剥胚 |
|--------|-------|--------|--------|---------|--------|
| 萌发率(%) | 7.19c | 36.19a | 18.33b | 15.56bc | 44.38a |

不同小写字母表示不同处理间差异达 0.05 显著水平。

2.3 取样时期对胚珠发育及萌发的影响

取样时期对无核葡萄及其正反杂交组合胚珠发育和萌发的影响见表 3,从表 3 可以看出,授粉后不同周数(4 周、5 周、6 周、7 周、8 周和 9 周)的无核葡萄莫利莎无核和希姆劳特及其正反交组合莫利莎无核×希姆劳特和希姆劳特×莫利莎无核,不同取样时期的大部分胚珠都能发育,但胚珠萌发的差异较大。

表 3 取样时期对无核葡萄品种及其正反交组合离体胚珠培养的影响

Table 3 The effect of sampling dates on the embryo germination of *in-vitro* cultured ovules in seedless grapes and their reciprocally crossed progenies

| 组 合 | 取样时期 (授粉后周数) | 接种数量 (枚) | 胚珠 | | 胚珠 | |
|------------|-----------------|-------------|-------|--------|-------|--------|
| | | | 数量(枚) | 发育率(%) | 数量(枚) | 萌发率(%) |
| 莫利莎无核 | 4 | 118 | 35 | 29.66 | 6 | 5.08 |
| | 5 | 122 | 59 | 48.36 | 22 | 18.03 |
| | 6 | 116 | 65 | 56.03 | 32 | 27.59 |
| | 7 | 104 | 72 | 69.23 | 37 | 35.58 |
| | 8 | 141 | 72 | 51.06 | 15 | 10.64 |
| | 9 | 138 | 63 | 45.65 | 12 | 8.70 |
| | 小计 | 739 | 366 | 49.53 | 124 | 16.78 |
| 希姆劳特 | 4 | 123 | 17 | 13.82 | 2 | 1.63 |
| | 5 | 147 | 67 | 45.58 | 21 | 14.29 |
| | 6 | 150 | 59 | 39.33 | 28 | 18.67 |
| | 7 | 126 | 38 | 30.16 | 15 | 11.90 |
| | 8 | 110 | 29 | 26.36 | 1 | 0.91 |
| | 9 | 120 | 16 | 13.33 | 0 | 0 |
| | 小计 | 776 | 226 | 29.12 | 67 | 8.63 |
| 莫利莎无核×希姆劳特 | 4 | 147 | 33 | 22.45 | 3 | 2.04 |
| | 5 | 112 | 51 | 45.54 | 11 | 9.82 |
| | 6 | 106 | 61 | 57.55 | 20 | 18.87 |
| | 7 | 136 | 92 | 67.65 | 45 | 33.09 |
| | 8 | 128 | 62 | 48.44 | 28 | 21.88 |
| | 9 | 118 | 39 | 33.05 | 12 | 10.17 |
| | 小计 | 747 | 338 | 45.25 | 119 | 15.93 |
| 希姆劳特×莫利莎无核 | 4 | 129 | 14 | 10.85 | 1 | 0.78 |
| | 5 | 135 | 37 | 27.41 | 6 | 4.44 |
| | 6 | 130 | 49 | 37.69 | 14 | 10.77 |
| | 7 | 122 | 75 | 61.48 | 24 | 19.67 |
| | 8 | 116 | 61 | 52.59 | 31 | 26.72 |
| | 9 | 141 | 53 | 37.59 | 12 | 8.51 |
| | 小计 | 773 | 289 | 37.39 | 88 | 11.38 |

从自然授粉的莫利莎无核葡萄不同取样时期的胚珠培养结果(表 3)可以看出,授粉后不同取样时期的胚珠均能发育和萌发,且其胚珠发育和萌发随着取样时期的延长呈现相同的变化趋势,即先升高后降低。其中,授粉后 7 周的胚珠发育率和萌发率均为最高,分别为 69.23%和 35.58%;授粉后 6 周的胚珠发育率和萌发率次之,分别为 56.03%和

27.59%;而授粉后 4 周的胚珠发育率和萌发率均为最低,分别比授粉后 7 周的低 39.57 个百分点和个百分点。这说明授粉后 7 周是莫利莎无核葡萄胚挽救的最佳取样时期。

从自然授粉的希姆劳特葡萄不同取样时期的胚珠培养结果(表 3)可以看出,授粉后不同取样时期的胚珠均能发育,其中授粉后 5 周的胚珠发育率最

高(为45.58%),授粉后6周的胚珠发育率次之,比授粉后5周的低6.24个百分点,之后随着取样时间的延长其胚珠发育率逐渐下降;授粉后不同取样时期的胚珠除授粉后9周的没有萌发外,其余不同取样时期的均能萌发,并以授粉后6周的萌发率为最高(为18.67%),而且比授粉后5周的胚珠萌发率高4.38个百分点,授粉后7周的次之。由此看出,授粉后6周可以作为希姆劳特葡萄胚挽救的最佳取样时期。

从莫利莎无核×希姆劳特杂交组合不同取样时期的胚珠培养结果(表3)中看出,该杂交组合在不同取样时期的胚珠均能发育和萌发,而且其胚珠萌发率的变化趋势与其胚珠发育率相同,即在授粉后4~9周的取样时期中,随着取样时期的延长其胚珠萌发率和发育率逐渐升高,之后逐渐降低。其中,授粉后4周的胚珠发育率和萌发率均为最低,分别为22.45%和2.04%;而授粉后7周的胚珠发育率和萌发率均为最高,分别是授粉后4周的胚珠发育率和萌发率的3.01倍和16.21倍。因此,授粉后7周取样是该无核杂交组合的最佳取样时期。

从希姆劳特×莫利莎无核杂交组合不同取样时期的胚珠培养结果(表3)中看出,授粉后不同取样时期的胚珠均能发育和萌发,但是其胚珠发育和萌发的变化趋势不一致,其中授粉后7周的胚珠发育率最高,授粉后8周的次之,分别为61.48%和52.59%;然而胚珠萌发率以授粉后8周的为最高,其次是授粉后7周的,分别为26.72%和19.67%。胚挽救技术是以幼胚败育前通过离体培养使其萌发生成苗为目的,因此对于该杂交组合应选择授粉后8周作为胚挽救的最佳取样时期。

此外,由表3还可以看出,自然授粉的莫利莎无核葡萄的胚珠平均发育率和平均萌发率均为最高,分别为49.53%和33.88%;莫利莎无核×希姆劳特杂交组合的平均发育率和平均萌发率次之;希姆劳特葡萄的均为最低,分别比希姆劳特×莫利莎无核杂交组合的胚珠发育率和萌发率低8.26个百分点和2.75个百分点,说明自然授粉的莫利莎无核葡萄及其正反交杂交组合的平均萌发率均高于自然授粉的希姆劳特葡萄。

3 讨论

胚挽救技术已经成为无核葡萄育种最有效的方

式之一,在无核葡萄胚挽救技术的影响因素中,培养基是影响胚挽救是否成功的重要因素之一^[6],它可以为离体培养条件下的幼胚提供继续发育所需的营养物质和激素。本试验在前人的研究基础上,以莫利莎无核葡萄为试验材料,通过研究发现该亲本的最佳萌发基本培养基种类为WPM,植物生长激素6-BA的最佳浓度为0.2 mg/L,因此胚珠萌发培养基组分为WPM培养基+6-BA 0.2 mg/L+水解酪蛋白50.0 mg/L+活性炭3.0 g/L+琼脂6.5 g/L+蔗糖20.0 g/L。

本研究还发现,对离体发育胚珠进行一定的处理均有助于提高胚珠的萌发出苗,这与赵密珍等^[24]、蒋爱丽等^[25]和夏培蓓等^[26]在不同的无核葡萄品种胚挽救技术中的研究结果一致。本研究发现剥胚的萌发率最高,横切次之,但是由于无核葡萄的种胚较小,剥胚处理难度较大,在剥离过程中极容易受到损伤,而且剥胚后的胚发育与横切的相比较为缓慢。横切处理方法简单易操作,对胚伤害较小,横切处理后的胚也能够胚乳和培养基的双重营养下萌发生长。此外,从本试验数据中看出,剥胚处理的胚珠萌发率虽然比横切处理的高8.19%,但二者之间的差异不显著。因此,采用横切处理是促进胚珠萌发最合理的处理方式。

董晓玲在早玫瑰和新玫瑰葡萄胚的研究中发现,胚的发育过程为多细胞原胚-球形胚-心型胚-鱼雷型胚-子叶型胚-成熟种子^[27]。之后,很多研究者发现心型胚中后期至鱼雷期是无核葡萄胚接种的最佳时期^[28-30]。王跃进等认为所有种子败育型无核葡萄的合子胚都有一个急剧败育时期^[31],但不同种子败育型无核葡萄品种的合子胚发育程度和败育时期是不同的^[11,17]。因此,取样接种时期也是影响无核葡萄胚挽救的重要因素。本研究结果显示,无核葡萄莫利莎无核、希姆劳特及其正反交杂交组合的最佳取材接种时期不同,其中莫利莎无核葡萄的最佳取样时期为授粉后7周,希姆劳特为授粉后6周,莫利莎无核×希姆劳特杂交组合为授粉后7周,希姆劳特×莫利莎无核杂交组合为授粉后8周。从不同品种及其不同杂交组合最佳取样时期的胚珠发育率和萌发率指标可以看出,莫利莎无核葡萄的胚珠发育率和萌发率最高,而希姆劳特葡萄的均为最低。此外,希姆劳特×莫利莎无核杂交组合胚珠发育率和萌发率也低于莫利莎无核×希姆劳特杂交组合,

这可能与希姆劳特葡萄的胚珠较小、营养不足等有关^[32],这也充分表明母本对胚珠萌发起着关键作用。因此,在无核葡萄胚挽救技术育种实践中,应当根据不同的亲本及其杂交组合进行不同的优化研究。

参考文献:

- [1] 李桂荣,王跃进,唐冬梅,等. 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.
- [2] 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):873-876.
- [3] RAMMING D W. The use of embryo culture in fruit breeding[J]. HortScience, 1990, 25(4):393-398.
- [4] LEDBETTER C A, BURGOS L. Inheritance of stenopermocarpic seedlessness in *Vitis vinifera* L.[J]. Journal of Heredity, 1994, 85(2):157-160.
- [5] 郭印山,郭修武,张海娥,等.利用胚挽救技术获得三倍体葡萄植株研究[J].沈阳农业大学学报,2005,36(5):606-608.
- [6] RAMMING D W, EMERSHAD R L. In-ovule culture of seeded and seedless *Vitis vinifera* [J]. HortScience, 1982, 17(3):487.
- [7] RAMMING D W, EMERSHAD R L. Embryo culture of early riping seeded grape genotypes [J]. HortScience, 1990, 25(3):339-342.
- [8] GRIBAUDO I, ZANETTI R, BOTTA R, et al. In ovule embryo culture of stenopermocarpic grapes[J].Vitis, 1993, 32: 9-14.
- [9] AGÜERO C, GREGORI M T, PONCE M T, et al. Improved germination of stenopermic grape fertilized ovules by low temperatures [J]. Biocell, 1996, 20: 123-126.
- [10] VALDEZ J G, ANDREONI M A, CASTRO P, et al. Variety response to direct germination of stenopermic seeds classified according to the hardness of their seed coats[J]. Acta Horticulturae, 2000, 528: 659-662.
- [11] GARCIA E, MARTINEZ A, CALERA E, et al. *In vitro* culture of ovules and embryos of grape for the obtention of new seedless table grape cultivars[J]. Acta Horticulturae, 2000, 528:663-666.
- [12] 王跃进,张剑侠,李桂荣,等.采用胚挽救技术获得抗病无核葡萄新材料的研究[J].甘肃农业大学学报,2001,36(专辑):105-109.
- [13] NOTSUKA K, TSURU T, SHIRAISHI M. Seedless-seedless grape hybridization via in ovule embryo culture[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2001, 70:7-15.
- [14] MIDANI A R, SHARMA H C, SINGH S K. Effect of ovule age on ovulo-embryo culture in seeded and seedless grape genotypes[J]. Indian Journal of Horticulture, 2002, 59:359-362.
- [15] PERL A, SAHAR N, ELIASSI R, et al. Breeding of new seedless table grapes in Isreal conventional and biotechnological approach [J]. Acta Horticulturae, 2003, 603:185-187.
- [16] BURGER P, GERBER C A, GERBER A, et al. Breeding seedless grapes in South African by means of embryo rescue [J]. Acta Horticulturae, 2003, 603:565-569.
- [17] LIU S M, SYKES S R, CLINGELEFFER P R. Improved in ovulo embryo culture for stenopermocarpic grapes (*Vitis vinifera* L.) [J]. Australian Journal of Agricultural Research, 2003, 54: 869-876.
- [18] SAHIJRAM L, KANAMADI V C. In ovulo hybrid embryo culture in controlled grape crosses involving stenopermocarpic parents [J]. Acta Horticulturae, 2004, 662:281-288.
- [19] 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.
- [20] 蒋爱丽,李世诚,金佩芳,等.胚培无核葡萄新品种—沪培1号的选育[J].果树学报,2007,24(3):402-403.
- [21] TIAN L L, WANG Y J, NIU L, et al. Breeding of disease-resistant seedless grapes using Chinese wild *Vitis* spp. *in vitro* embryo rescue and plant development [J]. Scientia Horticulturae, 2008, 117: 136-141.
- [22] RAMMING D W, EMERSHAD R L. Stenopermocarpic seedless *Vitis vinifera*×*Vitis rotundifolia* hybrid developed by embryo rescue [J]. Hortscience, 2000, 35(4):732-734.
- [23] BHARATHY P V, KARIBASAPPA G S, PATIL S G, et al. In ovule rescue of hybrid embryos in Flame seedless grapes-influence of pre-bloom sprays of benzyladenine [J]. Scientia Horticulturae, 2005, 106:353-359.
- [24] 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(2):166-168.
- [25] 蒋爱丽,李世诚,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,2002,20(1):45-48.
- [26] 夏培蓓,伍新宇,代培红,等.木纳格葡萄胚挽救影响因素的研究[J].新疆农业大学学报,2012,35(4):294-297.
- [27] 董晓玲.葡萄胚珠、胚乳及胚的发育[J].植物学通报,1990,7(1):53-55.
- [28] 王飞,王跃进,周建锡.无核葡萄与中国野生葡萄杂种的胚挽救技术研究[J].园艺学报,2006,33(5):1079-1082.
- [29] 田莉莉.抗病无核葡萄胚挽救育种及种质创新[D].陕西:西北农林科技大学,2007.
- [30] 唐冬梅.无核葡萄胚挽救新种质创建与技术完善[D].陕西:西北农林科技大学,2010.
- [31] 王跃进,江淑平,刘小宁,等.假单性结实无核葡萄胚败育机理研究[J].西北植物学报,2007,27(10):1987-1993.
- [32] 纪薇.无核葡萄胚挽救种质创新及畸形苗转化利用研究[D].陕西:西北农林科技大学,2013.

(责任编辑:袁伟)