

无核葡萄胚挽救技术的研究现状与展望

张剑侠*, 牛茹萱

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

摘要: 综合分析国内外相关文献及作者以往的研究经验, 阐述了无核葡萄胚挽救技术的研究现状, 讨论了影响无核葡萄胚挽救成功的主要因素, 包括亲本选择、取样时期、花期喷施生长调节剂、培养基、外源激素种类与浓度等, 并对胚挽救技术在无核葡萄育种上的发展进行了展望。

关键词: 无核葡萄; 胚挽救技术; 育种; 研究进展

中图分类号: S 663.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 09-1645-11

The Present Situation and Prospect of Embryo Rescue Technique Research in Seedless Grape Breeding

ZHANG Jian-xia* and NIU Ru-xuan

(College of Horticulture, Northwest A & F University, State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, Key Laboratory of Horticultural Plant Germplasm Resources Utilization in Northwest China, Ministry of Agriculture of China, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The present situation of embryo rescue technique in seedless grape breeding is expounded based on overall analysis of the related documents and our previous researches. The main factors affecting the success of in vitro embryo rescue including parents selection, sampling time, growth regulator spraying, basic media types, kinds and concentration of exogenous hormone etc., are discussed. The development of embryo rescue technique of seedless grapes breeding is also prospected.

Key words: seedless grape; embryo rescue; breeding; advance

无核葡萄由于食用方便, 在鲜食和制干方面占用独特的优势, 选育抗病无核葡萄优良品种也成为当今葡萄育种的主要目标之一。但无核性状却为常规杂交育种造成了障碍, 原因是无核葡萄不能形成种子, 在传统杂交育种中只能采用有核葡萄作母本, 无核葡萄作父本进行杂交。这种有性杂交方式选育无核葡萄的效率很低, 杂种后代中仅有 0 ~ 15.9% 的无核几率 (能塚一德, 1989), 选育 1 个无核品种至少需要 10 年以上。1982 年美国葡萄育种家 Ramming 和 Emershad (1982) 改变了传统的育种模式, 创立了无核葡萄胚挽救 (Embryo rescue) 技术, 以无核葡萄作母本进行杂交, 极大提高了杂种后代中的无核几率。能塚一德 (1989) 认为这种方法无核率即使不能达到 100%, 也可能达到相当高的比率。据 Ramming (1990) 的研究报道, 这一育种技术可使无核率达到 82%, 并比

收稿日期: 2013-06-28; **修回日期:** 2013-08-12

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项基金项目 (CARS-30-yz-7); 陕西省科学技术研究发展计划项目 (2011K02-10); 西北农林科技大学唐仲英作物育种基金项目 (2012-97)

* E-mail: zhangjx666@126.com, Tel: 029-87082613

传统育种方法至少缩短了 5 年时间。Burger 等 (2003) 应用胚挽救技术创建了无核品种 × 无核品种的杂种 2 632 株, 后代无核几率达到 56.1%~91.7%, 平均为 61.6%。这说明利用胚挽救技术进行无核葡萄育种, 不仅扩大了亲本的选择范围, 同时也简化了育种程序, 可去除中间母本和第 2 代回交, 提高了育种效率。采用该技术选育出的无核葡萄新品系已有十几个 (王跃进和万怡震, 2002), 并已在生产上推广应用, 如美国培育的无核品种 ‘Melissa’, 就是由 Ramming 等借助胚挽救技术从组合 ‘Crimson × B40-208’ 获得的。近年来, 本课题组也培育出 ‘秦红无核’ (爱莫无核 × 蓼蓼葡萄)、‘秦翠无核’ (底莱特 × 爱莫无核)、‘秦红一号’ (底莱特 × 红宝石无核) 等新品种。

但是, 由于对于无核性状遗传规律的认识还不够深入, 无核葡萄胚挽救中胚的发育率和成苗率低仍是困扰无核葡萄胚挽救育种的一个难题。作者通过查阅相关资料, 对无核葡萄胚挽救技术的研究进展进行了总结, 着重探讨影响无核葡萄胚挽救育种成败的主要因素, 旨在为利用该技术进行无核葡萄育种提供研究思路和技术参考。

无核葡萄根据其授粉结实的特性可分为两类: 一类称作单性结实型 (parthenocarpy), 就是卵细胞不经受精作用而由子房和花托直接发育成果实; 另一类称作假单性结实型 (pseudo-parthenocarpy), 也称作种子败育型 (stenospermocarpy), 即虽然受精, 但受精胚中途败育, 胚珠不能形成正常的种子而仅留下大小不同的种痕, 食用时不易感觉到它的存在, 习惯上也称之为无核葡萄, 如 ‘无核白’ (Thompson Seedless)、‘无核紫’ (Monukka)、‘火焰无核’ (Flame Seedless)、‘底莱特’ (Delight)、‘奥兰多无核’ (Orlando Seedless)、‘克瑞森无核’ (Crimson Seedless) 等。假单性结实型无核品种约占 85%, 在无核葡萄胚挽救育种中即是利用这一类型作母本。

1 无核葡萄胚挽救技术的研究进展

1.1 亲本选择

1.1.1 母本的选择

虽然假单性结实型无核品种易形成合子胚, 但不同品种胚珠发育进程和程度是有一定差异的 (张利 等, 1991; Garcia et al., 2000; 张大栋 等, 2004)。已有的研究表明, 只有发育到球形期以后的胚才容易挽救成活 (Yamashita et al., 1993), 因此母本胚的可挽救性是能否成功的关键因素 (Emershad et al., 1989; Gray et al., 1990; Gribaudo et al., 1993; Burger & Goussard, 1996; Garcia et al., 2000; Ponce et al., 2000)。首先, 不宜采用胚过早发生败育的品种, 如 ‘无核白’、‘Himrod’ 等 (徐海英 等, 2001a)。其次, 不宜采取可挽救性差的品种, Ponce 等 (2000) 研究认为 ‘奇妙无核’、‘火焰无核’、‘克瑞森无核’、‘优无核’ 等成苗率低于 5%, 因此不宜用作母本材料; Nicole 等 (2006) 研究表明, ‘Ruby Seedless’、‘Red Seedless’ 可获 68% 和 40% 的胚发育率, 而 ‘Superior’ 和 ‘Black Seedless’ 仅为 30%。现有的研究 (孟新法 等, 1993; Garcia et al., 2000; 徐海英 等, 2001a; 王壮伟 等, 2007; 唐冬梅 等, 2008) 表明, 成苗率较高的品种如 ‘红宝石无核’、‘波尔来特’、‘奥兰多无核’、‘红脸无核’、‘底莱特’、‘黎明无核’、‘京早晶’、‘京早白’ 等适宜用作母本。Gray 等 (1990) 在研究中发现无核葡萄自交成苗率一般比较低, 在胚挽救过程中应当注意此类现象。

1.1.2 父本的选择

杂交父本也对胚挽救有影响。通常用无核性状传递能力强的品种如 ‘无核白’、‘无核黑’, 或以起源于无核白、无核黑的品种或品系作父本, 以提高杂交后代无核性状的比例 (Cain et al., 1983)。在选择杂交父本时除保证无核性状外, 其他优良性状的选择也十分重要。圆叶葡萄 (*Vitis rotundifolia*) 以其独特的抗病虫性一直受到重视, 但由于圆叶葡萄 ($2n = 40$) 和欧洲葡萄 (*Vitis vinifera*) ($2n = 38$)

染色体数不同, 杂交不易亲和, 很难获得杂种。Ramming (1990) 报道, 利用欧亚种无核葡萄品种与圆叶葡萄杂交, 通过胚挽救技术, 获得了 20 株杂种苗, 经同工酶鉴定及植物形态分析, 证明有 19 株为亚属间杂种苗。原产中国的野生葡萄抗病抗逆性强, 且与欧亚种无核葡萄同属真葡萄亚属, 亲和性强, 近年来育种工作者采用中国野生葡萄作父本与无核葡萄杂交, 借助胚挽救技术, 以期选育抗病无核葡萄新品种。潘学军 (2005) 利用抗病性强的中国野生葡萄作父本与欧亚种无核葡萄杂交, 确定了不同基因型适宜的胚挽救时期, 并从已结果的杂种单株中选出抗病无核优系 '00-3-1' (爱莫无核 × 蔓蔓葡萄)。然而, 由于中国野生葡萄多数为雌雄异株 (仅有个别种的个别株系为两性花), 在利用中国野生葡萄为父本杂交进行胚挽救育种时, 有一些组合的 F_1 代出现部分雄株或果穗上果粒极少的现象, 这涉及到葡萄杂交亲本花型遗传的问题, 也说明了并非所有的中国野生葡萄都适宜作父本。虽然在利用圆叶葡萄或中国野生葡萄作父本与欧亚种无核品种作母本进行亚属间或种间杂交时还存在许多问题, 但采用胚挽救技术以获得抗病无核葡萄新品种依然是未来葡萄育种的方向。

1.2 接种时期

由于无核葡萄胚珠发育过程中有一个急剧败育期 (张利 等, 1991), 因此胚的发育形态及大小是幼胚培养成功的一个关键因素。郭修武等 (2007) 采用正交设计, 研究了接种时间和培养基种类对无核葡萄胚挽救的影响。结果表明, 影响无核葡萄胚挽救最重要的因素是接种时期, 在胚珠败育前进行胚挽救对于成功具有决定性影响。但迄今为止, 还没有一个选择最佳培养时期的普遍适用的方法或指标。孟新法等 (1993) 研究认为, 以浆果开始软化期作为接种的最佳时期最具有实践意义, 但 Gray 等 (1990) 同时指出, 果实软化后胚珠难于从周围的果肉中剥离, 因而认为最佳接种时期应以浆果开始转色前为宜。李桂荣等 (2004) 观察到无核葡萄胚珠发育到一定阶段后质量开始下降, 与胚的急剧败育期恰好相关联, 提出用胚珠质量可作为确定最佳接种时期的参考指标。大多数学者采用盛花后天数 (days after flowering, DAF) 作为接种时期的具体指标, 间接地反映胚珠内胚的发育程度。元桂梅 (2001) 认为由于不同品种的生长期不同, 胚发育的早晚及败育速度有很大差别, 成熟早的品种胚珠败育的时间早、速度快, 因此早熟品种胚珠的接种时间为授粉后 30 d 左右, 而中晚熟品种的接种时间为授粉后 40 ~ 50 d。徐海英等 (2005) 研究发现, 取样时期可以根据母本的成熟期确定, 早熟性品种于受精后 5 周取样, 中熟品种于受精后 6 周取样, 晚熟品种于受精后 9 周取样。但是这一方法在实际育种中, 由于同一品种在不同年份、不同气候条件、不同部位间也不尽相同, 可能影响到胚挽救效果的稳定性。因此, 不同地区应根据其具体的气候条件确定胚挽救取样的最佳时期。

1.3 花期喷施生长调节剂

为促进离体胚挽救成苗率, 有籽化技术也被应用于胚挽救, 相互结合进行无核葡萄的育种。Ponce 等 (2002) 于花前 5 d 对花穗喷施腐胺, 研究了其对 2 个无核品种 'Emperatriz' 和 'Fantasy' 胚挽救效果的影响。结果表明, 对于品种 'Emperatriz', 喷施 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 腐胺提高了胚的发育率, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 腐胺不影响胚的发育但增加了多胚的形成; 而对品种 'Fantasy', 喷施 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 腐胺提高了胚的发育率和萌发率, 而 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 腐胺与对照无差别, 但增加了多胚的形成。说明了喷施腐胺对胚发育和多胚形成具有一定的促进作用。

Bharathy 等 (2003) 研究了花前 10 d 和 3 d 各喷施 1 次 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 6-苄基氨基嘌呤 (BA) 对无核品种 'Thompson Seedless' 与 8 个有核品种或株系杂交的幼胚胚挽救的影响。结果表明, 多数组合的幼胚在发育率、萌发率、成苗率方面有显著提高。之后, Bharathy 等 (2005) 用同样的方法, 研究了无核品种 'Flame Seedless' 与 6 个不同父本品种或株系杂交的幼胚胚挽救的效果, 结果表明,

除 ‘Concord’ 作父本的组合外, 其他 5 个杂交组合的幼胚的发育率、萌发率和成苗率均显著提高, 因此认为花前喷施 BA 和父本基因型对胚挽救效果有重要影响。

Nookaraju 等 (2007) 研究了花前 10 d 和 3 d 各喷施 1 次 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ N} - (2 - \text{氯} - 4 - \text{吡啶基}) - \text{N} - \text{苯基脲}$ (CPPU) 及在 ER 培养基中添加不同浓度 BA 对 6 个无核品种胚挽救效果的影响, 花前喷施 CPPU 但在 ER 培养基中不添加 BA 时, ‘Crimson Seedless’、‘2A-Clone’、‘Maroo Seedless’ 和 ‘Mint’ 等 4 个无核品种的胚发育率提高, 其中 ‘Mint’ 喷施后为 41.00% (对照 ‘Mint’ 为 10.33%); 而喷施 CPPU 对品种 ‘Thompson Seedless’ 和 ‘Kishmis Chernyi’ 为负影响, 即胚发育率降低; 在喷施 CPPU 且 ER 培养基中添加 $0.89 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 时, 4 个品种的胚发育率达到最高, 分别为 9.40%、43.33%、41.33% 和 61.00%, 而 ‘Thompson Seedless’ 和 ‘Kishmis Chernyi’ 低于对照。因此认为, CPPU 和 BA 对胚的发育具有协同影响作用。

Agüero 等 (1995) 在接近开花期喷施 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 矮壮素 (CCC), 结果表明可以增加 3 个无核葡萄品种 ‘CG102.011’、‘Emperatriz’ 和 ‘Malvinas’ 浆果中胚珠的数量, 且使 ‘CG102.011’ 胚挽救成苗率提高。Tang 等 (2009) 在花前 14 d 用 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CCC 处理无核品种 ‘森田无核’, 发现能有效促进胚珠发育, 明显增加了胚的质量和大小, 有利于胚挽救成苗率的提高。

Agüero 等 (2000) 的研究还表明, 花后 5 d 喷施 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA_3 不利于无核品种 ‘Emperatriz’ 和 ‘Perlon’ 种子的发育且降低胚挽救中胚的萌发率; 花前 15 d 和 5 d 喷施 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 烯效唑 (赤霉素生物合成抑制剂) 也降低了胚挽救中胚的萌发率。

此外, Korpás 和 Hradilík (2006) 将 3 种赤霉素抑制剂 (B9、多效唑、矮壮素) 应用于两个无核品种 ‘Jupiter’ 和 ‘Neptún’ 的花前处理和胚挽救的培养基中, 发现它们具有促进种痕发展、胚的发育和愈伤组织形成以及萌发率和成苗率。目前, 无核葡萄有籽化技术与杂交胚挽救相结合, 应用于无核葡萄育种中仍处于探索阶段, 其作用机理的研究还未见涉及, 在实际的应用中还需在不同品种适用的药剂种类及浓度等方面继续研究验证。

1.4 培养基

1.4.1 基本培养基

胚挽救过程可分为 3 个阶段: 首先是胚珠内幼胚培养, 由于合子胚在败育前细胞数只有 4 ~ 50 个, 直接进行培养是非常困难的, 必须先培养胚珠让胚在其内继续增大发育, 充分发育成有较强萌发力的胚; 然后是胚萌发阶段, 胚珠培养一段时间后, 取出其中的幼胚, 培养在适合萌发的培养基上促使其萌发; 最后将萌发胚或幼苗转移到成苗培养基上使其发育成正常植株。在胚挽救过程的不同培养阶段所选用的基本培养基类型不同。目前, Nitsch 培养基与 ER 培养基, 被多数研究者认为比较适宜于葡萄胚珠培养 (Spiegel-roy et al., 1985; 唐冬梅 等, 2008, 2009; Tian et al., 2008) 而被广泛使用。还有研究表明, 新型 MM4 培养基 (专利号 ZL200610043024.0) 较适宜于中国本土葡萄资源并且更有利于胚发育和成苗 (田莉莉, 2007; 王爱玲 等, 2010)。Liu 等 (2008) 认为在培养基中增加 CaCl_2 浓度至 $0.66 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时能提高胚挽救的成功率。胚萌发和成苗培养基目前应用最多的是 1/2MS (Notsuka et al., 2001) 或 WPM 培养基 (Bharathy et al., 2003, 2005; Kebeli et al., 2003), 发育胚的萌发和成苗率一般能达到 70% 以上。在胚挽救过程中应注意基本培养基应随着胚的不同发育阶段而进行及时更换。在实际应用中, 对于不同的基因型, 应进行多次重复试验, 以找出适合的相应培养基类型, 从而提高胚挽救成功率。

1.4.2 外源激素

适宜的外源激素的种类及配比在外植体培养中起着重要的作用。不同的葡萄品种对激素的敏感

程度有显著的差异, 并且这种敏感程度随胚的发育程度不同而变化。胚的发育程度越高, 对激素的要求越不严格(徐海英等, 2001b)。对于胚珠内胚培养阶段是否需要添加外源激素, 目前存在不同看法。多数研究者认为, 培养基中附加适宜的外源激素对胚的发育具有促进作用。唐冬梅等(2008)的研究认为添加 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 比不加 BA 的无核葡萄胚挽救成功率高; Tian 等(2008)研究表明添加 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃ 和 $10.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 的 NN 培养基极大提高了胚挽救的成功率, 并且添加较低浓度的 ABA ($0.01 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 也有利于胚挽救成苗率的提高(田莉莉, 2007)。郭印山等(2006, 2008)认为, 幼胚的发育可能需要较高浓度的生长素(IBA)和相对较低浓度的赤霉素(GA₃)与细胞分裂素(BA), 在培养 87-1 × 京秀时采用 White 培养基 + IBA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA $0.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA $0.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时成苗率达到 95.08%。但是唐冬梅等(2008)发现在 ER 培养基中添加激素阻碍了胚的发育。另外一些学者则认为, 胚进入自养阶段后(自心形后期开始)自身已具备自主合成激素的能力, 胚珠培养基中不加任何激素也可获得成苗(Emershad et al., 1989)。目前大多数学者都支持培养基中添加适宜外源激素的观点。胚萌发及成苗培养阶段要求的激素相对简单, 甚至不加激素也可成苗, 但添加 BA 有利于胚的萌发(Emershad et al., 1989; Emershad & Ramming, 1994; Amaral et al., 2001; 蒋爱丽等, 2002)。

1.4.3 其他添加物

在胚挽救的培养基中除了添加激素外, 还有一些学者认为添加其他物质也可提高胚挽救的成苗率。Ponce 等(2002)、田莉莉(2007)和唐冬梅等(2008)认为添加腐胺有利于幼胚的萌发; 潘学军(2005)、王爱玲等(2010)认为添加脯氨酸有利于胚的发育和成苗。王壮伟等(2007)认为在 Nitsch 培养基中添加水解酪蛋白有利于提高‘金星无核’的萌发率, Liu 等(2008)也认为水解酪蛋白有利于胚的萌发和成苗。其他化学物质如秋水仙碱也被报道有促进胚发育的作用(董晓玲和贺普超, 1991; Bharathy et al., 2005)。由于葡萄胚珠中含有较多的酚类物质, 培养过程中容易氧化褐化, 在培养基中加入适量的抗褐化剂或吸附剂(如活性炭), 可吸附有害物质, 减轻对幼胚发育产生不利影响, Lu 等(1995)研究认为 0.3%活性炭有利于无核葡萄胚的发育。此外, 添加椰乳、麦芽提取物、香蕉泥等天然物质可能会对胚的发育有一定促进作用。

1.4.4 碳源

作为培养基的碳源, 碳水化合物能提供幼胚发育所需的能量, 提高培养基的渗透压, 是培养基不可缺少的成分。迄今为止, 蔗糖被认为是碳水化合物的最好形式, 对此众多学者都已形成共识。在胚发育阶段采用质量分数 6%高浓度蔗糖有利于胚的正常发育和防止早熟萌发(Emershad & Ramming, 1994; 王跃进和万怡震, 2002; 李桂荣等, 2004), 在胚萌发和成苗阶段, 蔗糖浓度适当降低(通常为 2%), 可以有效缓解高渗环境对胚萌发的抑制, 促进发育成熟的胚迅速萌发和成苗(王跃进等, 2001; 蒋爱丽等, 2002; 王跃进和万怡震, 2002)。

1.4.5 培养基形态

用于无核葡萄胚挽救的培养基主要有 3 种: 液相培养基、固相培养基、固-液双相培养基。关于培养基的形态, 不同研究者的看法并不一致。Gray 等(1987)在‘Orlando Seedless’自交胚珠的试验结果上认为固体培养基效果优于液体培养基。孟新法等(1992)的研究结果显示 3 种形态间差异不显著。笔者认为, 采用固体培养基时, 由于胚珠与培养基接触面较小, 不利于向胚珠提供营养; 采用液体培养基时, 培养基不完全浸没胚珠(一般浸没约 2/3, 主要考虑氧气供给), 胚珠与培养基的接触面较大, 有利于向胚珠提供营养, 但是较薄的液层在短期内易蒸发干枯, 培养过程中需不断补充添加培养基, 这样就增加了工作量和污染的机会; 因此本课题组在胚挽救育种中提出了应用固-液双相培养基(固相和液相成分相同, 只是液相不加琼脂), 可以弥补前两种培养基的缺陷, 经潘学军(2005)、Tian 等(2008)和唐冬梅等(2009)的应用结果表明, 固-液双相培养基培养效果

显著优于液相和固相培养基。

1.5 珠被处理

假单性结实型无核葡萄的珠被在发育早期与有核葡萄相似，珠被对于发育正常的有核品种的胚不存在阻碍作用，但对发育不完全的弱小胚则存在阻碍。可采用不同措施对胚珠珠被进行一定处理，如横切、切喙等，也可以剥取幼胚。很多学者认为横切或切喙可以显著提高胚珠萌发出苗率，尤其是横切处理不仅操作容易，对胚的伤害小，而且使胚能够在胚乳和培养基的双重营养下萌发生长，因而萌发效果更好 (Burger & Trautmann, 2000; Valdez, 2005; 程琳琳 等, 2007; 郭修武 等, 2007; 王壮伟 等, 2007)。对硬种壳品种剥胚能避免长期培养的胚再次败育，且正常苗比率高。但蒋爱丽等 (2002) 研究认为不剥胚比剥胚所得正常试管苗比率稍高。也有学者认为可利用低温替代剥胚来提高萌发率 (Agüero et al., 1996; 蒋爱丽 等, 2002)。虽然胚珠培养后再剥胚的培养程序较为复杂，但是可以提高无核葡萄胚的萌发率、成苗率并可使成苗时间提前，也有利于统计胚的真实发育率，只是剥胚时应注意不要伤及幼胚。这一方法已被越来越多的胚挽救技术使用者所接受。

1.6 培养条件

培养条件，如温度、光照也影响着胚挽救的效果。Agüero 等 (1996)、蒋爱丽等 (2002)、郭修武等 (2007)、程和禾等 (2008) 和王爱玲等 (2010) 认为在胚珠培养阶段用低温培养有助于提高萌发率和成苗率，可以取代剥胚的程序，但是唐冬梅等 (2008, 2009) 认为低温阻碍了胚的发育。究竟是否需要低温处理胚珠，还有待于进一步的研究。对于培养过程中光照的使用，一些学者采用全程光照条件 (徐海英 等, 2001b; 赵密珍 等, 2005)，Emershad 和 Ramming (1994) 则是在胚珠培养和胚萌发初期给予弱光，后期成苗时进行强光以提高成苗质量；而李世诚等 (1998) 和唐冬梅等 (2008, 2009) 等则认为在胚珠培养时使用暗培养有利于胚珠的发育。弱光照或暗培养对于胚珠培养似乎更合理，它实际上是模拟了胚在果实内发育过程中的光照条件。

2 展望

作为细胞工程之一的无核葡萄胚挽救技术，自发明至今已有 30 余年的历史，由于其突破了传统的育种方法的限制，使得无核品种间杂交、无核品种作母本与有核品种杂交、远缘杂交等成为可能，拓宽了无核葡萄育种中对亲本的选择范围，提高了无核葡萄育种的效率，加快了育种进程。然而，胚挽救中胚的发育率和成苗率低一直是制约胚挽救育种的关键因素，这就需要深入研究影响胚挽救的因素特别是幼胚败育的机理和培养基成分，以提高胚挽救育种的成效。可以预测，随着胚挽救技术的日益完善和成熟，将会出现工厂化的无核葡萄育种，也将会有源源不断的无核葡萄新品种问世和服务于无核葡萄生产。

利用胚挽救技术进行欧洲葡萄品种间杂交 (包括无核品种 × 无核品种，无核品种 × 有核品种) 是选育无核葡萄新品种的有效方法，但是由于欧洲葡萄的抗病抗逆性差，其杂交后代的抗性仍难于提高，原因是欧洲葡萄的抗性一般是由微效多基因控制，属于数量性状遗传，因此不利于培育抗病抗逆性强的无核葡萄新品种；此外，反复采用欧洲葡萄无核品种间杂交 (即种内杂交) 还会导致杂种遗传基础变窄，降低了有利的变异。利用野生葡萄的抗病抗逆性，通过胚挽救技术将其抗性基因导入欧洲葡萄无核品种中是一个有效的策略。中国野生葡萄资源丰富，其中的一些种和株系抗病、抗逆性强，现有的研究表明其存在有主效抗病基因 (刘延琳和贺普超, 1995; Wang et al., 1998; Zhang et al., 2002)，且不携带“狐味”，与欧洲葡萄无核品种杂交易亲和，可通过胚挽救技术获得

抗病抗逆性强的无核葡萄新品种。对于以中国野生葡萄作父本进行胚挽救育种中 F₁ 代出现一些雄株和果穗上果粒极少的问题, 一方面可以通过深入研究葡萄的花型遗传和选择优良的父本株系(尤其是两性花株系), 另一方面应注意利用中国野生葡萄与欧洲葡萄种间杂交 F₁ 代抗病抗逆性强的两性花优株作父本, 与假单性结实型无核葡萄作母本杂交, 培育抗病无核葡萄新品种。牛茹萱等(2012)研究表明, 在以‘波尔莱特’和‘红无籽露’作母本, 以欧山杂种优株‘00-1-10’和品种‘北醇’分别作父本, 其杂交胚株的发育率和成苗率明显高于中国野生山葡萄‘黑龙江实生’、‘双优’作父本的杂交胚株, 说明了拥有一半欧亚种葡萄遗传组成的 F₁ 优株(或品种)与欧亚种无核葡萄杂交具有良好的亲和力, 而且胚挽救获得的杂种中降低了野生葡萄的劣质性状, 有利于提高胚挽救育种的效果。

由于通过无核葡萄胚挽救技术获得的杂种后代中有核杂种还占有一定的比例, 特别是有核葡萄作父本的杂交组合, 因此, 一方面应深入研究无核性状的遗传规律和合理选择选配亲本, 另一方面可应用分子标记对杂种幼苗进行辅助选择, 以减少育种过程中人力、物力、财力和土地的投入, 从而提高育种效率。迄今, 已有 5 个无核基因分子标记可用于无核性状的辅助选择, 包括 SCAR 标记 SCC8 (Lahogue et al., 1998)、SCF27 (Mejía & Hinrichsen, 2003) 和 GSLP1-569 (王跃进和 Lamikanra, 2002), 以及微卫星标记 VMC7F2 (Cabezas et al., 2006) 和 p3-VvAGL11 (Mejía et al., 2011)。郭海江等(2005)、张剑侠等(2010)已初步应用葡萄无核基因探针 GSLP1 (王跃进和 Lamikanra, 2002) 和抗黑痘病基因 RAPD 标记 OPS03-1354 (张剑侠等, 2001, 2009) 对无核葡萄胚挽救幼苗进行了无核性状和抗黑痘病性状的辅助选择, 筛选出了一些抗病无核单株。Eda Karaagac 等(2012)应用微卫星标记 VMC7F2 对有核品种 × 无核品种、无核品种 × 无核品种杂交组合的后代进行了无核性状的辅助选择。由于分子标记与目标基因的连锁程度、适用的广泛性等影响着辅助选择的效率, 因此继续寻找紧密连锁的无核基因分子标记和抗病、抗逆基因分子标记仍是今后葡萄分子育种的重要内容。

References

- Agüero C, Gregori M T, Ponce M T, Iandolino A, Tizio R. 1996. Improved germination of stenospermic grape fertilized ovules by low temperatures. *Biocell*, 20: 123 - 126.
- Agüero C, Riquelme C, Tizio R. 1995. Embryo rescue from seedless grape vines (*Vitis vinifera* L.) treated with growth retardants. *Vitis*, 34: 73 - 76.
- Agüero C, Vigliocco A, Abdala G, Tizio R. 2000. Effect of gibberellic acid and uniconazol on embryo abortion in the stenospermocarpic grape cultivars Emperatriz and Perlon. *Plant Growth Regular*, 30: 9 - 16.
- Amaral A L, Oliveira P R, Czerański A B, Camargo U A. 2001. Embryo growth stages on plant obtention from crosses between seedless grape parents. *Rev Bras Frutic*, 23 (3): 647 - 651.
- Bharathy P V, Karibasappa G S, Biradar A B, Kulkarni D D, Solanke A U, Patil S G, Agrawal D C. 2003. Influence of pre-bloom sprays of benzyladenine on *in vitro* recovery of hybrid embryos from crosses of Thompson seedless and 8 seeded varieties of grape (*Vitis* spp.). *Vitis*, 42: 199 - 202.
- Bharathy P V, Karibasappa G S, Patil S G, Agrawal D C. 2005. In ovule rescue of hybrid embryos in flame seedless grapes—influence of pre-bloom sprays of benzyladenine. *Sci Hort-Amsterdam*, 106: 353 - 359.
- Burger P, Gerber C A, Gerber A, Ellis P J. 2003. Breeding seedless grapes in South African by means of embryo rescue. *Acta Hort*, 603: 565 - 569.
- Burger P, Goussard P G. 1996. *In vitro* culture of ovules and embryos from seedless grape (*Vitis vinifera* L.). *South African Journal for Enology and Viticulture*, 17 (2): 31 - 37.
- Burger P, Trautmann I A. 2000. Manipulations of ovules to improve *in vitro* development of *Vitis vinifera* L. embryos. *Acta Hort*, 528: 613 - 619.

- Cabezas J A, Cervera M T, Ruiz-Garcia L, Carreno J, Martínez-Zapater J M. 2006. A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine. *Genome*, 49 (12): 1572 - 1585.
- Cain D W, Emershag R L, Tarailo R E. 1983. In-ovulo embryo culture and seedling development of seeded and seedless grape (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, 22: 9 - 14.
- Cheng He-he, Wu Ya-qin, Zhao Yan-hua, Wu Yong-jie, Li Yu-sheng, Zhao Sheng-jian. 2008. Studies on embryo rescue techniques of Otilia Seedless grape. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 12 (11): 30 - 32. (in Chinese)
程和禾, 吴雅琴, 赵艳华, 吴永杰, 李玉生, 赵胜建. 2008. 奥迪亚无核葡萄胚抢救技术研究. *河北农业科学*, 12 (11): 30 - 32.
- Cheng Lin-lin, Wang Yue-jin, Shi Yan, Zhang Jian-xia, Tang Dong-mei, Zhang Zong-qin. 2007. Study on factors affecting embryo rescue of seedless grape. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 27 (7): 1317 - 1322. (in Chinese)
程琳琳, 王跃进, 石 艳, 张剑侠, 唐冬梅, 张宗勤. 2007. 无核葡萄胚挽救影响因素的研究. *西北植物学报*, 27 (7): 1317 - 1322.
- Dong Xiao-ling, He Pu-chao. 1991. Studies on the embryo development and in ovule embryo culture of seedless grape variety Youngle. *Journal of Fruit Science*, 8 (2): 55 - 58. (in Chinese)
董晓玲, 贺普超. 1991. 无核葡萄杨格儿的胚发育及胚培养. *果树科学*, 8 (2): 55 - 58.
- Eda Karaagac, Alba M Vargas, María Teresa de Andrés, Iván Carreño, Javier Ibáñez, Juan Carreño, José Miguel Martínez-Zapater, José Antonio Cabezas. 2012. Marker assisted selection for seedlessness in table grape breeding. *Tree Genetics & Genomes*, 8: 1003 - 1015.
- Emershad R L, Ramming D W, Serpe M D. 1989. In ovulo embryo development and plant formation from stenospermic genotypes of *Vitis vinifera*. *American Journal of Botany*, 76 (3): 397 - 402.
- Emershad R L, Ramming D W. 1994. Somatic embryo genesis and plant development from immature zygotic embryos of seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports*, 14: 6 - 12.
- Garcia E, Martinez A, Garcia de la Calera E, Perez L J, Cenis J L, Carreño J. 2000. *In vitro* culture of ovules and embryos of grape for the obtention of new seedless table grape cultivars. *Acta Hort*, 528: 663 - 666.
- Gray D J, Fisher L C, Mortensen J A. 1987. Comparison of methodologies for in ovule embryo rescue of seedless grapes. *HortScience*, 22 (6): 1334 - 1335.
- Gray D J, Mortensen J A, Benton C M. 1990. Ovule culture to obtain progeny from hybrid seedless bunch grapes. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*, 115 (6): 1019 - 1024.
- Gribaudo I, Zanetti R, Botta R, Vallania R, Eynard I. 1993. In ovule embryo culture of stenospermocarpic grape. *Vitis*, 32: 9 - 14.
- Guo Hai-jiang, Wang Yue-jin, Zhang Jian-xia, Pan Xue-jun, Tang Dong-mei, Tian Li-li. 2005. Development of resitant and seedless grape germplasms by embryo rescue and marker-assisted. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 25 (12): 2395 - 2401. (in Chinese)
郭海江, 王跃进, 张剑侠, 潘学军, 唐冬梅, 田莉莉. 2005. 葡萄抗病无核胚挽救育种及分子标记辅助选择. *西北植物学报*, 25 (12): 2395 - 2401.
- Guo Xiu-wu, Guo Yin-shan, Zhang Hai-e, Li Yi-hui, Li Cheng-xiang. 2007. Effects of culture medium and inoculating date on embryo rescue of seedless grape. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (2): 329 - 332. (in Chinese)
郭修武, 郭印山, 张海娥, 李轶晖, 李成祥. 2007. 接种时期和培养基对无核葡萄胚挽救的影响. *园艺学报*, 34 (2): 329 - 332.
- Guo Yin-shan, Guo Xiu-wu, Zhang Hai-e, Li Yi-hui, Li Cheng-xiang. 2006. Studies on the factors affecting embryo rescue of the crossed progeny between diploid and tetraploid grape cultivars. *Journal of Fruit Science*, 23 (1): 115 - 117. (in Chinese)
郭印山, 郭修武, 张海娥, 李轶晖, 李成祥. 2006. 葡萄二倍体和四倍体杂交胚挽救的影响因素. *果树学报*, 23 (1): 115 - 117.
- Guo Yin-shan, Zhang Hai-e, Guo Xiu-wu, Li Yi-hui, Li Cheng-xiang. 2008. Research on embryo rescue technology in early-ripening grape. *Sino-Overseas Grapevine and Wine*, (1): 11 - 15. (in Chinese)
郭印山, 张海娥, 郭修武, 李轶晖, 李成祥. 2008. 早熟葡萄胚抢救技术研究. *中外葡萄与葡萄酒*, (1): 11 - 15.
- Jiang Ai-li, Li Shi-cheng, Jin Pei-fang, Luo Jun. 2002. A study on technique of plantlet formation for large vestigial ovules culture of seedless grape. *Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science*, 20 (1): 45 - 48. (in Chinese)
蒋爱丽, 李世诚, 金佩芳, 骆 军. 2002. 大败育型无核葡萄胚珠培养成苗技术研究. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 20 (1): 45 - 48.
- Kebeli N, Boz Y, Özer C. 2003. Studies on the applying of embryo culture in breeding new hybrids by crossing seedless grape cultivars. *Acta*

- Horticulturae, 625: 279 - 281.
- Korpás A, Hradilík J. 2006. Possibilities of the utilization of antigibberellins in seedless table grape breeding. *Acta Hort*, 827: 229 - 232.
- Lahogue F, This P, Bouquet A. 1998. Identification of a codominant scar marker linked to the seedlessness character in grapevine. *Theor Appl Genet*, 97: 950 - 959.
- Li Gui-rong, Wang Yue-jin, Tang Dong-mei, Luo Qiang-wei. 2004. Study on the sampling dates of embryo rescue techniques for seedless grape. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 27 (5): 17 - 21. (in Chinese)
- 李桂荣, 王跃进, 唐冬梅, 骆强伟. 2004. 胚挽救无核葡萄新品种取样时期的研究. *河北农业大学学报*, 27 (5): 17 - 21.
- Li Shi-cheng, Jin Pei-fang, Jiang Ai-li, Luo Jun. 1998. Ovule culture to obtain triploid progeny from crosses between seedless cultivars and tetraploid grapes. *Acta Agriculturae Shanghai*, 14(4): 13 - 17. (in Chinese)
- 李世诚, 金佩芳, 蒋爱丽, 骆军. 1998. 与四倍体杂交的无核葡萄胚珠培养获得三倍体植株. *上海农业学报*, 14 (4): 13 - 17.
- Liu S M, Sykes S R, Clingeleffer P R. 2008. Effect of culture medium, genotype, and year of cross on embryo development and recovery from *in-vitro* cultured ovules in breeding stenopericarpic seedless grape varieties. *Australian journal of agricultural research*, 59 (2): 175 - 182.
- Liu Yan-lin, He Pu-chao. 1995. Study on the inheritance of resistance to downy mildew of F₁ generation of interspecific hybrids of *Vitis*. *Acta Horticulturae Sinica*, 22 (1): 29 - 34. (in Chinese)
- 刘延琳, 贺普超. 1995. 葡萄属种间杂交一代对霜霉病抗性遗传的研究. *园艺学报*, 22 (1): 29 - 34.
- Lu J, Lamikanra O, Ramming D W, Schell L. 1995. Developing seedless grapes by embryo rescue. *Proc-Vitic-Sci-Symp*, 18: 26 - 30.
- Mejía N, Hinrichsen P. 2003. A new, highly assertive SCAR marker potentially useful to assist selection for seedlessness in table grape breeding// Hadju E, Borbás É. ed. *Acta Horticulturae: Proceedings of the 8th International Conference on Grape Genetics and Breeding*, (603): 559 - 564.
- Mejía N, Soto B, Guerrero M, Casanueva X, Houel C, Miccono M A, Ramos R, Le Cunff L, Boursiquot J M, Hinrichsen P, Adam-Blondon A F. 2011. Molecular, genetic and transcriptional evidence for a role of *VvAGL11* in stenopericarpic seedlessness in grapevine. *BMC Plant Biology*, 11: 57.
- Meng Xin-fa, Zhang Li, Zhang Lu-sheng, Wang Wen-zhen. 1992. Study on ovule development of seedless grapes and its early culture *in vitro*: III. Effect of culture methods on embryo development *in vitro*. *Journal of China Agricultural University*, 18 (4): 393 - 395. (in Chinese)
- 孟新法, 张利, 张潞生, 王素珍. 1992. 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. *中国农业大学学报*, 18 (4): 393 - 395.
- Meng Xin-fa, Zhang Li, Zhang Lu-sheng, Zhang Zi-lian. 1993. Study on ovule development of seedless grapes and its early culture *in vitro*: IV. The effect of inoculation dates on embryo development. *Journal of China Agricultural University*, 19 (1): 45 - 47. (in Chinese)
- 孟新法, 张利, 张潞生, 张子莲. 1993. 无核葡萄胚发育及早期离体培养的研究: IV. 胚珠接种时期对胚发育的影响. *中国农业大学学报*, 19 (1): 45 - 47.
- 能塚一德. 1989. 应用胚珠培养高效育成葡萄无籽品种. 张耀宏译. *农业新技术新方法译丛*, 24 (1): 29 - 31.
- Nicole Hewstone O, Jorge Valenzuela B, Carlos Munoz Sch. 2006. Cultivar effect in the development of stenopericarpic grape embryos cultured *in vitro*. *Agricultura Técnica*, 66 (2): 124 - 132.
- Niu Ru-xuan, Zhang Jian-xia, Wang Yue-jin, Zhai Huan, Zhao Kai. 2012. Embryo rescue of seedless grape with disease and cold resistance. *Journal of Fruit Science*, 29 (5): 825 - 829. (in Chinese)
- 牛茹萱, 张剑侠, 王跃进, 翟焕, 赵凯. 2012. 抗病抗寒无核葡萄胚挽救研究. *果树学报*, 29 (5): 825 - 829.
- Nookaraju A, Barreto M S, Karibasappa G S, Agrawal D C. 2007. Synergistic effect of CPPU and benzyladenine on embryo rescue in six stenopericarpic cultivars of grapevine. *Vitis*, 46 (4): 188 - 191.
- Notsuka K, Tsuru T, Shiraiishi M. 2001. Seedless-seedless grape hybridization via *in vitro* ovule embryo culture. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 70 (1): 7 - 15.
- Pan Xue-jun. 2005. Innovating in the technique system of embryo rescue of stenopericarpic grape and breeding new cultivars of both seedless and disease-resistance traits [Ph. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 潘学军. 2005. 无核抗病葡萄胚挽救技术体系的优化及新品种培育 [博士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Ponce M T, Agüero C B, Gregori M T, Tizio R. 2000. Factors affecting the development of stenoperic grape (*Vitis vinifera*) embryo cultured in

- vitro. Acta Horticulturae, 528: 667 - 671.
- Ponce M T, Guinazu M, Tizio R. 2002. Effect of putrescine on embryo development in the stenoepimerocarpic grape cvs Emperatriz and Fantasy. Vitis, 41: 53 - 54.
- Qi Gui-mei. 2001. Several factors affecting hybrid ovule culture and germinate of seedless grape. Sino-overseas Grapevine and Wine, (4): 24 - 27. (in Chinese)
- 元桂梅. 2001. 无核葡萄杂交胚珠的培养及萌发成苗的若干影响因素. 中外葡萄与葡萄酒, (4): 24 - 27.
- Ramming D W, Ledbetter C A, Tarailo R. 1990. Hybridization of seedless grapes. Vitis, (Special issue): 439 - 444.
- Ramming D W, Emershad R L. 1982. In-ovule embryo culture of seeded and seedless *V. vinifera* L. Horticultural Science, 17 (3): 487.
- Ramming D W. 1990. The use of embryo culture in fruit breeding. HortScience, 25: 393 - 398.
- Spiegel-roy P, Sahar N, Baron J, Lavi U. 1985. *In vitro* culture and plant formation from grape cultivars with abortive ovules and seeds. Journal of the American Society for Horticultural Science, 110 (1): 109 - 112.
- Tang Dong-mei, Cai Jun-she, Luo Qiang-wei, Liao Xin-fu, Sun Feng, Zhao Rong-hua, Fu Xiao-min. 2008. Study on embryo rescue technique for seedless grape breeding. Journal of Fruit Science, 25 (3): 316 - 321. (in Chinese)
- 唐冬梅, 蔡军社, 骆强伟, 廖新福, 孙 锋, 赵荣华, 符晓敏. 2008. 用于无核葡萄选育的胚挽救技术研究. 果树学报, 25 (3): 316 - 321.
- Tang D M, Wang Y J, Cai J S, Zhao R H. 2009. Effects of exogenous application of plant growth regulators on the development of ovule and subsequent embryo rescue of stenospermic grape (*Vitis vinifera* L.). Scientia Horticulturae, 120: 51 - 57.
- Tang Dong-mei, Wang Yue-jin, Zhao Rong-hua, Pan Xue-jun, Cai Jun-she, Zhang Jian-xia, Zhang Chao-hong, Luo Qiang-wei. 2009. Factors influencing embryo development in embryo rescue of seedless grapes. Scientia Agricultura Sinica, 42 (7): 2449 - 2457. (in Chinese)
- 唐冬梅, 王跃进, 赵荣华, 潘学军, 蔡军社, 张剑侠, 张朝红, 骆强伟. 2009. 无核葡萄胚挽救中影响胚发育的因子. 中国农业科学, 42 (7): 2449 - 2457.
- Tian Li-li. 2007. Breeding for the disease-resistant seedless grape novel varieties and innovating of new germplasms using embryo rescue [Ph. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 田莉莉. 2007. 抗病无核葡萄胚挽救育种及种质创新[博士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Tian L L, Wang Y J, Niu L, Tang D M. 2008. Breeding of disease-resistant seedless grapes using Chinese wild *Vitis* spp. *in vitro* embryo rescue and plant development. Sci Hort-Amsterdam, 117: 136 - 141.
- Valdez J G. 2005. Immature embryo rescue of grapevine (*Vitis vinifera* L.) after an extended period of seed trace culture. Vitis, 44: 17 - 23.
- Wang Ai-ling, Wang Yue-jin, Tang Dong-mei, Zhang Jian-xia, Zhang Chao-hong. 2010. Research on improvement of seedling rate in embryo rescue of seedless grapes. Scientia Agricultura Sinica, 43 (20): 4238 - 4245. (in Chinese)
- 王爱玲, 王跃进, 唐冬梅, 张剑侠, 张朝红. 2010. 提高无核葡萄胚挽救中幼胚成苗率的研究. 中国农业科学, 43 (20): 4238 - 4245.
- Wang Y, Liu Y, He P. 1998. Resistance of Chinese *Vitis* species to *elsinoe ampelina* (de Bary) shear. HortScience, 33 (1): 123 - 126.
- Wang Yue-jin, Lamikanra O. 2002. Application and synthesis on the DNA probe for detecting seedless genes in grapevine. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition, 30 (3): 42 - 46. (in Chinese)
- 王跃进, Lamikanra Olusola. 2002. 检测葡萄无核基因 DNA 探针的合成与应用. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2002, 30 (3): 42 - 46.
- Wang Yue-jin, Wan Yi-zhen. 2002. Review of grape production and researches in California of US. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition, 30 (1): 134 - 140. (in Chinese)
- 王跃进, 万怡震. 2002. 美国加州的葡萄生产与科研. 西北农林科技大学: 自然科学版. 30 (1): 134 - 140.
- Wang Yue-jin, Zhang Jian-xia, Li Gui-rong, Tang Dong-mei, Luo Qiang-wei. 2001. Obtention of new resistant seedless grape materials by embryo rescue techniques. Journal of Gansu Agricultural University, 36 (Special issue): 105 - 111. (in Chinese)
- 王跃进, 张剑侠, 李桂荣, 唐冬梅, 骆强伟. 2001. 采用胚挽救技术获得抗病无核葡萄新材料的研究. 甘肃农业大学学报, 36 (专辑): 105 - 111.
- Wang Zhuang-wei, Zhao Mi-zhen, Wu Wei-min, Qian Ya-ming, Yuan Ji. 2007. Study on techniques of ovule culture for seedless grape. Acta Agriculture Jiangxi, 19 (2): 27 - 29. (in Chinese)

- 王壮伟, 赵密珍, 吴伟民, 钱亚明, 袁 骥. 2007. 无核葡萄胚珠培养技术研究. 江西农业学报, 19 (2): 27 - 29.
- Xu Hai-ying, Zhang Guo-jun, Yan Ai-ling. 2001a. Breeding of seedless grape and selection of its hybrid parent. Sino-overseas Grapevine and Wine, (3): 30 - 32. (in Chinese)
- 徐海英, 张国军, 闫爱玲. 2001a. 无核葡萄育种及杂交亲本的选择. 中外葡萄与葡萄酒, (3): 30 - 32.
- Xu Hai-ying, Yan Ai-ling, Zhang Guo-jun. 2001b. Study on the In ovule embryo culture of the crossed progeny between diploid and tetraploid grape cultivars. Journal of Fruit Science, 36 (9): 111 - 115. (in Chinese)
- 徐海英, 闫爱玲, 张国军. 2001b. 葡萄二倍体与四倍体正反杂交及其胚挽救. 甘肃农业大学学报, 36 (9): 111 - 115.
- Xu Hai-ying, Yan Ai-ling, Zhang Guo-jun. 2005. Determination of the proper sampling period for embryo rescue from crosses between diploid and tetraploid grape cultivars. Scientia Agricultura Sinica, 38 (3): 629 - 633. (in Chinese)
- 徐海英, 闫爱玲, 张国军. 2005. 葡萄二倍体与四倍体品种间杂交胚挽救取样时期的确定. 中国农业科学, 38 (3): 629 - 633.
- Yamashita H, Horiuchi S, Taira T. 1993. Development of seeds and growth of triploid seedlings obtained from reciprocal crosses between diploids and tetraploids grapes. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 62 (2): 249 - 255.
- Zhang Da-dong, Ji Xiao-jia, Ma Hong-xiang, Yang Yong-hua. 2004. Abortion process of ovule and embryo of several seedless grape species. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 20 (1): 61 - 62. (in Chinese)
- 张大栋, 吉晓佳, 马鸿翔, 杨永华. 2004. 几种无核葡萄品种的胚珠和胚的败育进程. 江苏农业学报, 20 (1): 61 - 62.
- Zhang Li, Meng Xin-fa, Zhang Lu-sheng, Zhang Hong-ming, Wang Su-zhen. 1991. A study on ovule development of seedless grape and its early culture *in vitro*. Journal of China Agricultural University, 17 (4): 54 - 59. (in Chinese)
- 张 利, 孟新法, 张潞生, 张宏明, 王素珍. 1991. 无核葡萄胚珠发育及早期离体培养的研究. 中国农业大学学报, 17 (4): 54 - 59.
- Zhang Jian-xia, Wang Yong, Wang Yue-jin, Zhang Yan-yan. 2010. Marker-assisted selection for hybrids from cross between seedless and disease-resistant grape. Journal of Northeast Agricultural University, 41 (6): 55 - 63. (in Chinese)
- 张剑侠, 王 勇, 王跃进, 张艳艳. 2010. 利用分子标记对无核抗病葡萄杂交后代的辅助选择. 东北农业大学学报, 41 (6): 55 - 63.
- Zhang Jian-xia, Wang Yue-jin, Xu Yan. 2002. The resistance of Chinese wild *Vitis* to *Uncinula necator* and its inheritance in F₁ generation. Agricultural Sciences in China, 1 (2): 195 - 199.
- Zhang Jian-xia, Wang Yue-jin, Zhou Peng, Wang Xi-ping, Zheng Xue-qin. 2001. RAPD marker of resistance gene to anthracnose in Chinese wild *Vitis*. Journal of Fruit Science, 18 (2): 68 - 71. (in Chinese)
- 张剑侠, 王跃进, 周 鹏, 王西平, 郑学勤. 2001. 中国野生葡萄抗黑痘病基因的 RAPD 标记. 果树学报, 18 (2): 68 - 71.
- Zhang Jian-xia, Wang Yue-jin, Zhang Yan-yan, Zhou Bang-jun. 2009. Cloning and sequence analysis of the RAPD marker linked to anthracnose-resistance gene in Chinese wild *Vitis* and its application for marker-assisted breeding. Journal of Fruit Science, 26 (4): 456 - 460. (in Chinese)
- 张剑侠, 王跃进, 张艳艳, 周邦军. 2009. 中国野生葡萄抗黑痘病基因 RAPD 标记的克隆、序列分析及辅助育种应用. 果树学报, 26 (4): 456 - 460.
- Zhao Mi-zhen, Su Jia-le, Qian Ya-ming, Wang Zhuang-wei, Diao Man-ni. 2005. Technology of ovule culture for ruby seedless grape cultivar. Journal of Fruit Science, 22 (2): 166 - 168. (in Chinese)
- 赵密珍, 苏家乐, 钱亚明, 王壮伟, 刁曼妮. 2005. 红宝石无核葡萄胚珠培养成苗技术研究. 果树学报, 22 (2): 166 - 168.