

无核葡萄与中国野生葡萄杂种胚发育和败育的细胞学研究^{*}

王 飞, 王跃进, 周会玲, 万怡震, 杨进孝

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 测定了无核葡萄品种及其杂种胚珠和浆果不同发育时期的重量和纵横径, 并对其进行了细胞学观察。结果表明: (1) 不同葡萄品种及杂种组合的胚发育、败育时期不同。(2) 无核葡萄及其杂种的胚珠重量和纵横径增加到一定阶段时停止, 而浆果在胚珠停止发育时仍继续发育。(3) 细胞学观察发现, 无核葡萄、有核葡萄及其杂种胚的发育都经历合子胚→多细胞时期→小球形胚→大球形胚→心形胚→鱼雷胚→成熟胚的各个时期。(4) 胚败育的主要原因是合子胚发育不良, 珠心、珠被细胞提早解体退化; 胚乳不分裂或只进行1~2次分裂; 授粉、受精不良。因此, 在胚珠发育停止前, 重量和纵横径最大且胚发育为心形胚时, 对无核葡萄及其杂种进行胚挽救易获成功。

[关键词] 无核葡萄; 中国野生葡萄杂种胚; 胚珠; 胚败育; 细胞学分析

[中图分类号] S663.103.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)02-0061-05

无核葡萄大多属欧洲种, 虽品质优良、产量高, 但抗性较差, 易遭受各种病害危害^[1], 使无核葡萄品种的优良性状难以充分表现。我国是野生葡萄的原产大国^[1,2], 种类多且抗逆性强。因此, 利用中国野生葡萄资源向欧洲无核葡萄导入抗性基因, 培育无核、抗逆性强的新品种势在必行。有研究^[3]表明, 以假单性结实的葡萄为母本, 有核葡萄为父本进行杂交, 杂种后代存在胚败育现象, 但无核率高^[3]。反之, 杂种后代的无核率低^[4], 甚至为零。本研究以假单性结实的无核葡萄为母本, 中国野生葡萄为父本进行杂交, 通过细胞学观察, 胚珠重量、纵横径的变化确定杂种胚发育以及胚败育的时期和机理, 以期对无核葡萄及其杂种胚挽救提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

选用的葡萄品种为红光无核和红光无核×黑龙江实生(山葡萄 *V. amurensis* Rupr.) 杂种, 分别取自新疆鄯善葡萄瓜果研究中心品种圃和生产园, 以及西北农林科技大学葡萄种质资源圃。

1.2 方 法

1.2.1 杂 交 父本为黑龙江实生, 于04-16左右采集花粉, 并贮藏。母本为红光无核花穗去雄, 为防

止葡萄闭花受精, 除选最适宜的去雄时期外, 在取雄后用喷雾器喷清水, 喷后迅速套袋。每组合10穗, 每穗约100~150朵花, 人工授粉3次, 进行杂种幼果田间管理, 于杂交后不同时间对不同组合进行取样研究。

1.2.2 细胞学观察 在授粉后2~55 d, 每3 d采1次样, 剥取胚珠, 用卡诺固定液固定。随后转入FAA固定液中, 制成8~10 μm厚石蜡切片, 经常规方法二甲苯脱蜡后, 放入质量浓度为4%的铁矾水溶液媒染12 h, 再用质量浓度为0.1%的苏木精溶液染色2 h, 冲洗, 封片, 用日本奥林巴斯研究显微镜, 观察杂种后代胚发育的动态及形态并照像。

1.2.3 胚珠重量与纵横径的测定 授粉受精后30 d开始随机取样, 每个组合30个果粒, 并从中随机取30枚胚珠, 用万分之一电子天平称取果粒、胚珠重量, 用游标卡尺测定果粒与胚珠的纵横径, 取平均值。

2 结果与分析

2.1 无核葡萄及其杂种浆果、胚珠重量以及纵横径的变化

由表1可知, 红光无核及红光无核×黑龙江实生在自然授粉后30~45 d, 胚珠重量及纵横径一直

^{*} [收稿日期] 2004-04-08

[基金项目] 国家948项目(98-1043); 教育部博士点基金项目(980701)

[作者简介] 王 飞(1954-), 女, 河南孟津人, 教授, 博士, 主要从事果树种质资源与栽培生理研究。

呈持续增加趋势, 45 d 达到最大, 随后, 多数胚珠开始退化, 纵横径以及胚珠重量开始减小, 而浆果的重量均呈上升趋势。说明在田间自然情况下, 无核葡萄、无核葡萄 × 有核葡萄的杂交组合胚珠发育到一定阶段会停止发育, 随后胚珠外部由绿变黄, 再由黄到褐, 重量逐渐减轻, 内腔逐渐空瘪, 而浆果的发育

呈持续增加趋势。所以, 对无核葡萄以及用无核葡萄作母本的杂交组合进行胚挽救时, 应在胚败育前, 胚发育程度最大, 存活率最多, 胚珠最饱满, 即胚珠重量最高, 纵横径最大时进行离体胚珠培养, 效果较佳。

表 1 无核葡萄、无核葡萄 × 有核葡萄浆果重、胚珠重量及纵横径的变化

Table 1 The change of berry weight, ovule weight, vertical, and horizontal diameter about seedless, seedless × seeded, seeded grape

授粉后天数/d Days after pollination	红光无核(自然授粉) Flame seedless(nature-cross-pollination)				红光无核 × 黑龙江实生 Flame seedless × Heilongjiang seedling			
	浆果重/g Berry weight	胚珠重/mg Ovule weight	横径/mm Horizontal diameter	纵径/mm Vertical diameter	浆果重/g Berry weight	胚珠重/mg Ovule weight	横径/mm Horizontal diameter	纵径/mm Vertical diameter
30	0.78	15.2	1.013	2.050	0.5	22	1.021	2.022
35	0.88	21.8	1.020	2.298	0.61	25.8	1.124	2.148
40	1.07	23.5	1.116	2.485	0.64	26.2	1.294	2.481
45	1.12	25.4	1.640	3.011	0.82	30.4	1.382	2.610
50	1.14	25.0	1.112	2.186	0.90	23.2	1.202	2.082
55	1.25	23.2	1.108	2.175	1.04	21.4	1.186	2.064

2.2 无核葡萄及其杂种胚的发育过程

从表 2 可以看出, 合子第一次分裂约在盛花后 15~20 d 进行, 盛花后 27 d 开始出现小球形胚。此时已接近果实生长第 I 期末(盛花后 30 d), 浆果生

长开始变慢, 种子充分长大, 因此, 在浆果生长第 I 期的前 15 d, 葡萄胚大部分时间处于休眠状态, 而胚乳在第 9~11 天已开始进行分裂。

表 2 红光无核、红光无核 × 黑龙江实生的胚发育时期

Table 2 The development of embryo about Flame seedless, Flame seedless × Heilongjiang seedling

品种 Varieties	胚乳第一次分裂 First division endosperm	合子第一次分裂 First division of zygote	小球形胚 Smaller globular embryo	大球形胚 Globular embryo	心形胚 Heart- shape embryo	鱼雷形胚 Torpedo- shape embryo	成熟胚 Full sized embryo
红光无核 Flame seedless	11	15~20	28~30	34~37	41~45	-	-
红光无核 × 黑龙江实生 Flame seedless × Heilongjiang seedling	9	15~19	27~29	35~37	40~43	48~54	70

盛花后约 30~48 d 为浆果发育的第 II 时期, 此期经历大球形胚和心形胚时期, 40 d 左右开始形成心形胚, 至盛花后 48 d 出现鱼雷胚, 此时正值浆果生长从第 II 期转向第 III 期, 即始熟期, 浆果开始着色, 果实开始软化。从第 II 期后半期开始, 胚迅速生长, 并持续至第 III 期, 这个时期也正是心形胚开始形成并逐渐向鱼雷胚转化的时期, 此时无核葡萄的胚开始进入大量败育期。因此, 若在这个时期之前进行葡萄胚珠离体培养, 胚萌发和成苗的机率较高。

无核葡萄品种及其杂种, 均是胚乳的发育早于胚, 初生胚乳盛花后 9 d 开始第一次分裂, 盛花后 15 d, 当合子第一次分裂时胚乳已全部细胞化, 至盛花后 30 d, 已见胚乳充满胚囊(有核品种), 但无核葡萄及其杂种胚乳核不分裂或只进行 1~2 次分裂, 导致胚乳细胞提早解体, 胚乳败育, 不能提供胚继续发育

的营养, 随之胚发育停止, 不能形成可育种子。胚乳的发育是在浆果生长第 I 期进行和完成的, 胚乳由大体一致的多角形小细胞构成, 细胞间隙极小。胚乳的发育早于胚, 这是植物在长期进化过程中形成的, 以使胚能够得到胚乳提供的充足营养, 达到生长和分化的目的。

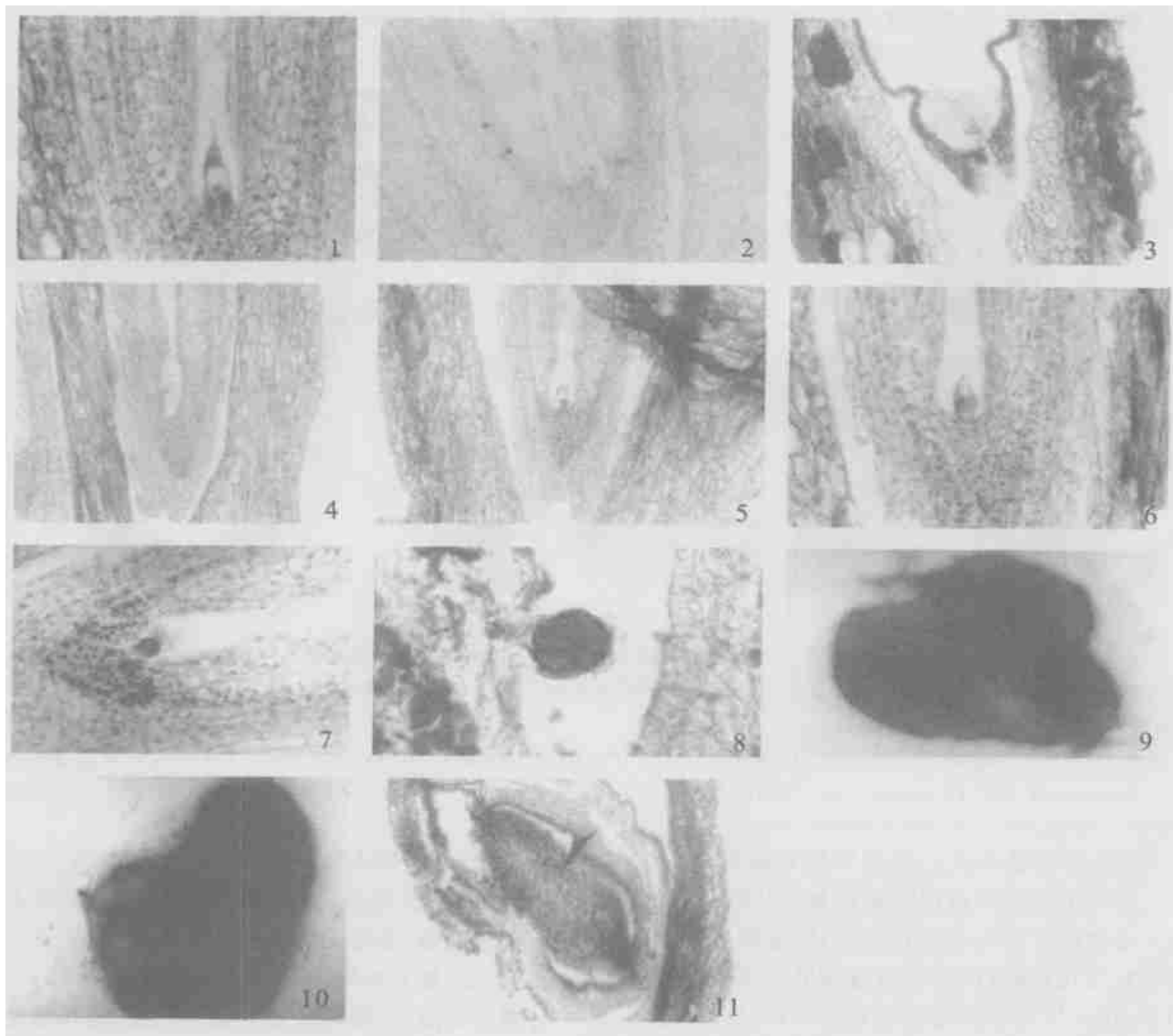
2.3 无核葡萄及其杂种胚发育的细胞学观察

败育型无核葡萄品种胚的早期发育与有核葡萄胚的发育基本相似, 但无核葡萄以及无核 × 有核葡萄未曾观察到或很少观察到心形胚发育以后的各个时期。

无核葡萄紧靠多胚珠的喙部, 由胚乳包围, 无核葡萄、无核葡萄 × 有核葡萄的胚均在受精后 15~20 d 开始分裂。细胞学观察结果表明: (1) 盛花后 2 d 可见到 8 核胚, 卵细胞位于 2 个极核细胞之间(图版

I-1)。(2)盛花后 6 d, 8 核胚轮廓消失, 极核细胞解体, 受精卵(合子胚)休眠(图版 I-2)。(3)盛花后 9 d 出现胚乳核第一次分裂, 并接着进行第 2 次分裂(图版 I-3)。(4)盛花后 10 d 为细胞的受精卵时期(图版 I-4)。(5)盛花后 15 d 为受精卵第一次分裂形成二细胞时期(图版 I-5)。(6)盛花后 18 d 可观察到

多细胞时期(16 核时期)(图版 I-6)。(7)盛花后 26 ~ 30 d 可观察到小球形胚(图版 I-7)。(8)盛花后 35~ 37 d 可观察到大球形胚(图版 I-8)。(9)盛花后 40~ 52 d 形成心形胚(图版 I-9, 10)。(10)盛花后 70 d 可观察到成熟胚(图版 I-11)。



图版 I 无核葡萄与中国野生葡萄杂种胚发育的显微观察

1. 8 核胚, $\times 200$; 2. 合子胚休眠(花后 6 d), $\times 200$; 3. 胚乳核第 1 次分裂(盛花后 9 d), $\times 400$; 4. 胚囊中靠近珠孔的受精卵(花后 10 d), $\times 200$; 5. 分裂的合子胚(花后 15 d), $\times 200$; 6. 16 核胚囊(花后 18 d), $\times 200$; 7. 小球形胚(花后 28 d), $\times 200$; 8. 球形胚(花后 35 d), $\times 400$; 9. 心形胚(花后 44 d), $\times 40$; 10. 心形胚(花后 52 d), $\times 40$; 11. 成熟胚(花后 70 d), $\times 100$

Plate I Microscopic observation of embryo development in hybrid progeny of seedless grape and Chinese wild grapes

1. 8-nucleate embryo sac (2d AFB), $\times 200$; 2. Dormancy of zygote (6 d AFB), $\times 200$; 3. First division of primary endosperm nucleus (9 d AFB), $\times 400$; 4. The zygote in embryo sac near micropyle (10 d AFB), $\times 200$; 5. Divided zygote (15 d AFB), $\times 200$; 6. 16-nucleate embryo (16 d AFB), $\times 200$; 7. Smaller globular embryo (28 d AFB), $\times 200$; 8. Globular embryo (35 d AFB), $\times 400$; 9. Heart-shape embryo (44 d AFB), $\times 40$; 10. Heart shape embryo (52 d AFB), $\times 40$; 11. Mature embryo (70 d AFB), $\times 100$

只有极少数无核葡萄品种能完成上述发育阶段, 大多数无核葡萄品种以及无核 $\times$ 有核葡萄的合

子胚在不同阶段停止发育,并随之解体,不能形成有生活力的种子,导致果实无种子,形成无核葡萄。

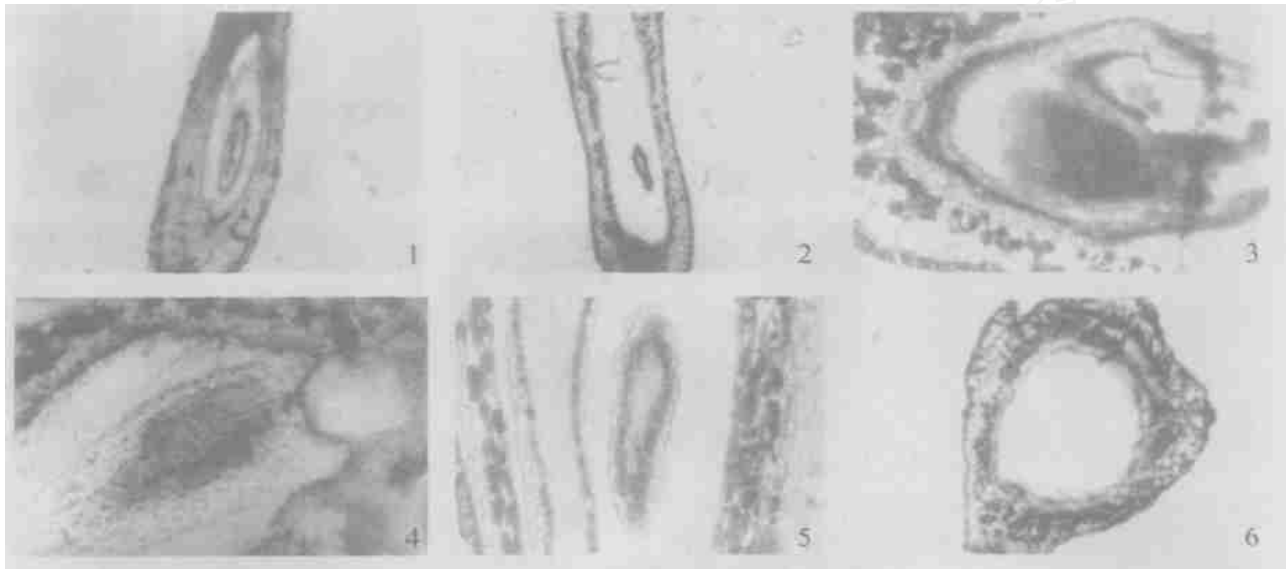
2.4 无核葡萄胚败育的细胞学观察

经细胞学观察(图版 II-1~6)可以看出,无核葡萄及其杂种胚的败育大致有以下 3 个方面的特征。

(1) 珠心、珠被细胞发育不正常。在授粉后 30 d 左右,珠心组织不发达,外珠被和内珠被异常,珠被细胞逐渐解体退化,其细胞的核膜、核仁消失,细胞失去原来的形状,结构变得松散零乱(图版 II-1, 2),

随后珠心、珠被细胞逐渐萎缩,最后可在子房内观察到细胞退化解体留下的碎片和空腔。

(2) 胚乳核不分裂或只进行 1~2 次分裂,导致胚败育。约在花后 15 d 内,无核葡萄品种少数胚乳核只进行了 1~2 次分裂(图版 II-3),大部分胚珠的胚乳核不分裂而逐渐退化,胚乳退化最后引起胚败育。胚乳消失,胚也随之败育(图 II-4, 5)。



图版 II 无核葡萄与中国野生葡萄杂种败育的显微观察

1, 2 珠心珠被细胞退化的胚珠(花后 55 d), $\times 200$; 3 败育的胚(花后 60 d), $\times 200$; 4, 5 逐渐退化解体的胚囊(花后 60 d), $\times 200$; 6 子房内胚珠退化解体后留下的空腔(花后 65 d), $\times 100$

Plate II Microscopic observation of embryo abortion in hybrid progeny of seedless grape and Chinese wild grapes

1, 2 Degenerated cells of integument(55 d AFB), $\times 200$; 3 Abortive proembryo(60 d AFB), $\times 200$; 4, 5 Abortive proembryo sac(60 d AFB), $\times 200$; 6 The cavity left by abortive ovule(65 d AFB), $\times 100$

(3) 授粉受精不良。观察子房或胚珠,其中有 15%~20% 的子房未出现受精现象,随着时间的推移,未正常受精的子房内,成熟胚珠结构逐渐退化,珠心细胞也在退化,胚珠内的细胞器较早解体,整个胚珠腔中空,仅几层珠被细胞包围着胚珠腔(图版 II-6)。而更早的败育发生在大孢子体形成过程中,约有 15%~20% 无核葡萄子房未出现受精现象,胚囊内的卵器以及其他细胞、珠心细胞较早解体,胚囊腔中空或仅几层珠被细胞包围着胚珠腔(图版 II-3)。

3 讨论

3.1 葡萄无核品种及其杂种胚珠重量、纵横径变化与杂种胚败育的关系

假单性结实的无核葡萄品种及其杂种胚的发育受母体影响极大^[4~6]。在杂交组合中以无核品种作

母本,即使父本有核胚的发育也按母本固有的发育特性进行,葡萄无核品种及其杂种胚发育到 35~50 d 会出现夭折现象。本研究结果表明,无论是无核品种自然授粉,还是无核品种 $\times$ 有核品种,胚珠重量与胚珠的纵横径均随取样时间的推移先增加,在一定时期达到最高,随后开始下降。因此,无核葡萄及其杂种胚的挽救应在胚珠重量、纵横径最大时进行,其胚珠培养效果最佳。

3.2 无核葡萄及其杂种细胞学研究

无核葡萄及杂种胚发育与有核葡萄胚发育过程基本一致,均经过合子胚 $\rightarrow$ 多细胞时期 $\rightarrow$ 小球形胚 $\rightarrow$ 大球形胚 $\rightarrow$ 心形胚 $\rightarrow$ 鱼雷胚 $\rightarrow$ 成熟胚各个时期,但无核葡萄及其杂种胚发育过程中易出现胚败育现象。姚家琳等^[7]在观察杏胚胎发育时,也发现了珠心、珠被发育异常会导致胚提早败育。本研究也发现

无核葡萄及其杂种胚发育的异常现象, 通过对无核葡萄及其杂种的细胞学观察, 发现胚败育的关键时期是胚由心形胚向鱼雷胚转化时期, 此时是葡萄盛花后 35~ 50 d。正是无核葡萄合子胚败育的高峰期, 因无核葡萄及其杂种第 II 期发育时间较有核葡萄短^[1], 胚的生长发育时期短, 再加上胚与果肉竞争养分, 能发育到成熟的胚则更少^[8], 所以在心形胚后期进行胚挽救效果较好。

3.3 无核葡萄及其杂种胚败育与胚乳的关系

无核葡萄及其杂种胚的败育不仅与授粉受精不良、合子胚发育异常以及珠心、珠被发育不正常有关, 而且与胚乳的提早解体、退化有关, 胚乳败育或

退化是引起胚败育的关键因素, 大部分无核葡萄及其杂种只进行 1~ 2 次分裂, 而后逐渐退化, 而部分无核品种及其杂种胚乳根本不分裂。因谷氨酰胺和半胱氨酸在胚乳中占有相当大的比例, 通过加入谷氨酰胺和半胱氨酸对无核葡萄及其杂种幼胚进行挽救, 在实践中已取得良好效果^[9]。胚乳对胚的重要作用已被应用到远缘杂种以及杂种幼胚的胚培养上, 如活性胚乳法培养幼胚以及胚乳的看护培养等^[9]。笔者在进行无核葡萄及其杂种胚挽救研究中, 通过加入酪蛋白、小麦胚碾磨汁液, 促进了无核葡萄及其杂种胚的发育和成苗。由此可见, 无核葡萄及其杂种胚的败育与胚乳核的分裂具有十分密切的关系。

[参考文献]

- [1] 贺善超, 罗国光. 葡萄学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994
- [2] 王跃进. 中国葡萄属野生种质资源的研究利用[J]. 中国野生植物, 1989, (2): 11- 13
- [3] Emershaw R L, Ranning D W. Somatic embryo genesis and plant development from immature zygotic embryos of seedless grapes (*Vitis vinifera* L.) plant cell[J]. Reports, 1994, (14): 6- 12
- [4] Narayanaswami S K. Plant embryo culture[J]. Bot Rev, 1964, (30): 587- 608
- [5] Ranning D W, Emershaw R L. In vitro embryo culture of seeded and seedless (*Vitis vinifera* L.) [J]. Hort Sci, 1982, 17(3): 487.
- [6] Emershaw R L, Ranning D W. In vitro embryo development genotypes of *Vitis vinifera* [J]. Amer J Bot, 1989, 76(3): 397- 402
- [7] 姚家琳, 付春华, 胡春根. 杏胚胎发育中败育现象的研究[J]. 华中农业大学学报, 2002, 19(1): 71- 73
- [8] Emershaw R L, Ranning D W. In vitro embryo culture of *Vitis vinifera* L. cv. "Thompson seedless" [J]. Amer J Bot, 1984, 71(71): 873- 876
- [9] 李俊明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002

Cytological study of embryo development and abortion in hybrid progeny of seedless grape and Chinese wild grapes

WANG Fei, WANG Yue-jin, ZHOU Hui-ling, WAN Yi-zhen, YANG Jin-xiao

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The cytological observation and study of changes of weights, and vertical and horizontal diameters of ovules and berries in different development stages of hybrid progeny seedless grape and Chinese wild grapes show s: (1) There are difference stages of embryo abortion and embryo development among different varieties and hybridization crosses (2) The weight, vertical and horizontal diameters of ovules of seedless grape and hybrid progeny will stop growing when they reach certain stages while berry continues its growth (3) In seeded, seedless grapes and hybridized crosses, the course of embryo development was: zygote → proembryo with many cells → smaller globular embryo → larger globular embryo → heart-shape embryo → torpedo-shape embryo → mature embryo. (4) The mechanism of embryo abortion in seedless grapes may be caused by the following reasons: poor development of Zygote, degeneration of nucellar cells or integument in early stage; endosperm nucleus undivided or only one or two divided endosperm nucleus or abortive ovule caused by failure fertilization. Therefore Before ovule stops development, weight and vertical and horizontal diameters are the biggest. Embryo rescue is easy to be achieved successfully when embryo development reaches stage of heart-shape or torpedo-shape.

Key words: seedless grape; Chinese wild grapes; hybrid progeny; ovule embryo abortion; cytological analysis