

# 两个无核葡萄品种胚及胚乳败育的细胞学研究

刘 巧, 张立华, 王跃进, 张剑侠

(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:**以 2 个引自美国的种子败育型无核葡萄品种“木星”、“海王星”为试材, 采用石蜡切片技术和铁矾苏木精染色法, 对这 2 个品种的胚、胚乳进行细胞学观察, 以期了解其胚败育的时期, 从而确定其用作胚挽救母本时的最佳取样时期。结果表明: 花后 38 d 和 36 d, “木星”、“海王星”的胚分别开始发生败育; “木星”、“海王星”用作胚挽救母本的最佳取样时期分别是花后 38 d 和 36 d。

**关键词:**无核葡萄; 胚败育; 胚乳败育; 石蜡切片; 胚挽救; 取样时期

**中图分类号:**S 663.103.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)03-0031-05

无核葡萄品种“木星”<sup>[1]</sup>和“海王星”<sup>[2]</sup>以其无核、具有一定的抗寒性而成为无核抗寒葡萄育种的重要材料。胚挽救是无核葡萄育种的重要途径, 限制该技术的重要因素之一是胚珠培养的取样时期, 由于无核品种基因型的不同, 最佳取样时期不同。一般而言, 在胚发育分化程度达到最高但未败育时, 将其进行离体培养的效果最佳<sup>[3]</sup>。在最适宜时期进行胚珠离体培养, 是制约胚挽救成功与否的重要前提<sup>[4-5]</sup>。即使同一品种, 胚的败育并不一致, 然而都存在快速败育的阶段, 而且不同品种间胚急速败育阶段存在差异。通常胚发育分化程度越高, 对培养条件的要求越简单, 并且容易得到发育完全的植株<sup>[3]</sup>。胚挽救在胚的发育程度最高时进行离体培养, 比较容易获得成苗。如果培养时间过早, 合子胚数量多, 但胚较小, 发育程度低, 需要添加复杂的营养及调节物质进行培养<sup>[6]</sup>,

不易成功; 而过晚, 大部分合子胚已退化, 未败育的合子胚发育程度高, 培养基成分可相对简单, 容易成苗, 但萌发成苗数量少。因此, 研究不同无核品种胚、胚乳的细胞发育进程, 不仅能够揭示无核葡萄形成的机理, 而且能为无核葡萄胚挽救提供一定的技术参考。该试验采用石蜡切片技术及铁矾苏木精染色法, 对葡萄胚胎进行染色观察, 研究“木星”、“海王星”胚、胚乳的生长发育进程, 了解其胚发生败育的时期, 从而确定其作为胚挽救母本时的最佳取样时期, 为胚挽救育种提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为无核葡萄品种“木星”和“海王星”, 2009 年引自美国, 保存于西北农林科技大学葡萄种质资源圃, 其特性见表 1。

表 1

材料特性

Table 1

The characteristics of materials

品种 Cultivar	亲本组合 Parents combination	特性 Characteristics
“海王星” ‘Neptune’	美洲葡萄×欧亚种 <i>Vitis labrusca</i> L. × <i>Vitis vinifera</i> L.	果穗中等偏小, 穗型紧凑, 果粒黄绿色, 椭圆形到卵圆形, 种子败育, 抗裂果, 耐寒性强, 早熟 Small cluster, compact panicle, yellow green berries, elliptic to ovate, stenospermocarpic, resistance to fruit cracking, hardiness, early-maturing
“木星” ‘Jupiter’	美洲葡萄×欧亚种 <i>Vitis labrusca</i> L. × <i>Vitis vinifera</i> L.	果穗中等偏小, 圆锥形, 果粒深红色, 种子败育, 有玫瑰香味, 抗裂果, 耐寒性强, 抗葡萄真菌病害, 早熟 Small cluster, conicalness, dark red berries, stenospermocarpic, rose flavor, resistance to fruit cracking, hardiness, resistance to most common fungus diseases of grapevine, early-maturing

### 1.2 试验方法

试验于 2013 年 6—12 月在农业部西北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室和旱区作物逆境生物

学国家重点实验室进行。

1.2.1 取材 依据前人研究<sup>[7-8]</sup>, 结合葡萄生长过程, 于 2013 年观察供试 2 个无核葡萄品种发育过程, 从“木星”和“海王星”花后 30 d 开始取样, 其中“木星”盛花期是 5 月 6 日, “海王星”盛花期是 5 月 14 日, 每隔 1 d 取样 1 次, 每次取果粒 5 粒。取样时选取植株上中下部生长势一致的果穗, 于果穗中部随机取一粒浆果, 放入冰盒中带回实验室。

1.2.2 制片与观察 将采集的幼果立即剥取胚珠, 称重, 并将其快速置于卡诺氏固定液 (Carnoy's Fluid or carnoys fixative) 中固定 24 h, 后期胚珠较硬, 先将其置于 5% NaOH 溶液中软化 2 周左右, 以解剖刀能顺利无阻

**第一作者简介:**刘巧(1988-), 女, 硕士, 研究方向为葡萄种质资源与生物技术。E-mail:330166912@qq.com.

**责任作者:**张剑侠(1964-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为葡萄种质资源与生物技术。E-mail:zhangjx666@126.com.

**基金项目:**国家现代农业产业技术体系建设专项基金资助项目(CARS-30-yz-7); 西北农林科技大学唐仲英作物育种基金资助项目(2014-97)。

**收稿日期:**2015-10-08

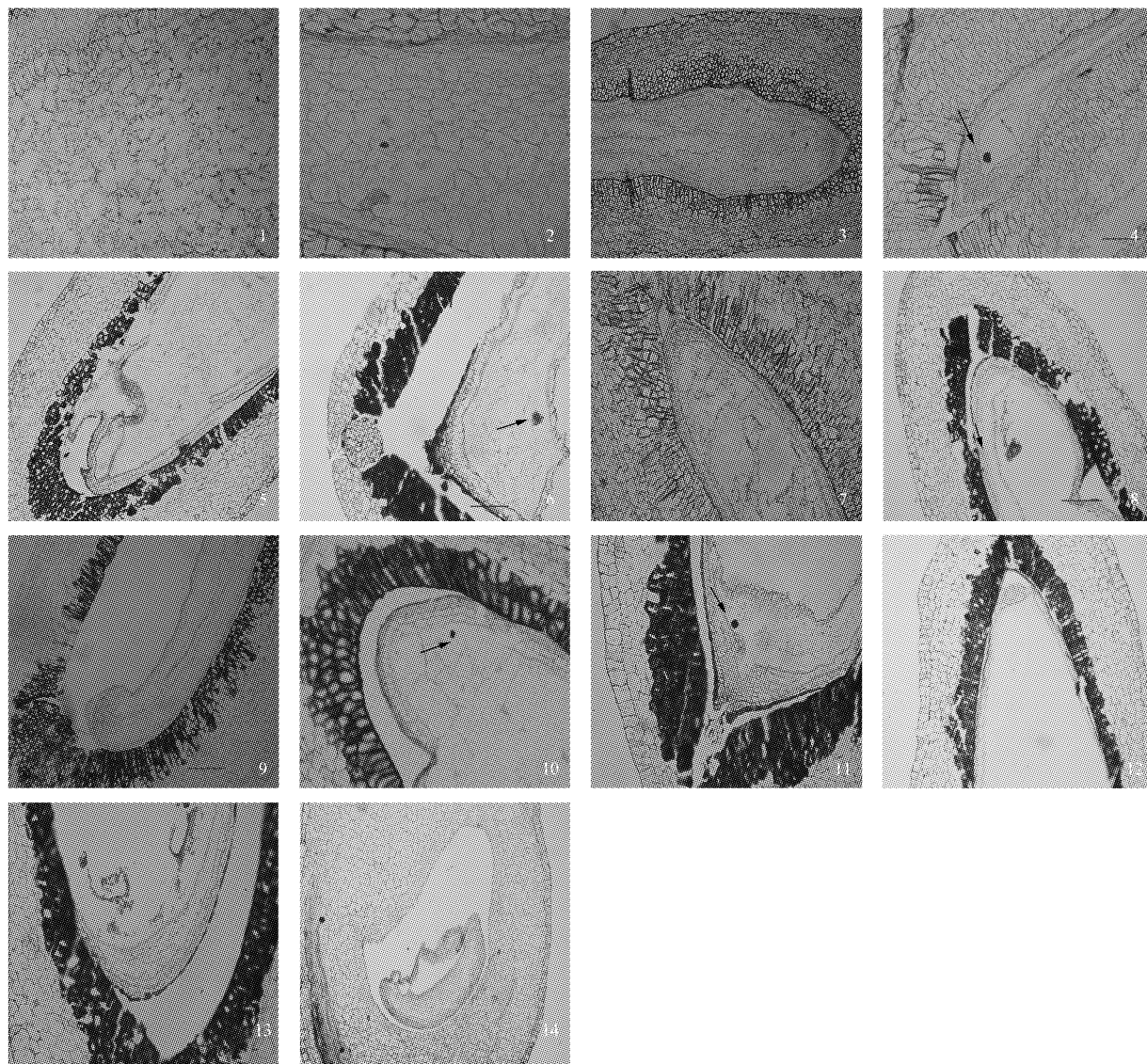
地剖开为宜。将固定好的胚珠进行梯度脱水(70%乙醇、85%乙醇、95%乙醇、100%乙醇、100%乙醇,每级2 h),随后进行透明(1:1乙醇:二甲苯、二甲苯、二甲苯,每级1 h),之后浸蜡(57℃,48 h)包埋,制成10 μm厚的石蜡切片,将切片放入染色缸中进行脱蜡,脱蜡过程中先使用二甲苯,然后是二甲苯:酒精=1:1,再分别使用100%、95%、85%、75%的酒精。随后用4%铁矾进行媒染1 h,再用0.5%的苏木精染色4~5 h,期间观察染色

情况,然后用流水冲洗分色,依次转入50%乙醇二甲苯和二甲苯中,用中性树胶进行封片。Olympus显微镜下进行镜检,选择有说明性的切片拍照。细胞学时期确定参考胡适宜<sup>[9]</sup>的图片。

## 2 结果与分析

### 2.1 “木星”葡萄胚、胚乳败育的细胞学研究

“木星”花后32 d,可观察到细胞化的胚乳核(图1-1);



注:1.“木星”花后32 d,胚乳细胞化,×200;2.“木星”花后34 d,多细胞原胚,×200;3.“木星”花后36 d,胚乳充满胚囊,×100;4.“木星”花后38 d,球形胚,×200;5.“木星”花后40 d,胚乳退化,×100;6.“木星”花后42 d,败育的胚,×200;7.“木星”花后42 d,退化的胚乳,×200;8.“木星”花后44 d,心形胚,×100;9.“木星”花后46 d,皱缩胚囊,×100;10.“木星”花后48 d,败育的胚,×100;11.“木星”花后50 d,球形胚,×200;12.“木星”花后50 d,退化的双胚,×200;13.“木星”花后50 d,空胚囊腔,×100;14.“木星”花后52 d,畸形胚囊,×100。

Note:1. 'Jupiter' cellular endosperm (32 d AFB), ×200; 2. 'Jupiter' globular embryo (34 d AFB), ×200; 3. 'Jupiter' embryo sac filled with endosperm (36 d AFB), ×100; 4. 'Jupiter' globular embryo (38 d AFB), ×200; 5. 'Jupiter' degenerating endosperm (40 d AFB), ×100; 6. 'Jupiter' aborting embryo (42 d AFB), ×200; 7. 'Jupiter' degenerating endosperm aborting embryo (42 d AFB), ×200; 8. 'Jupiter' heart-shape embryo (44 d AFB), ×100; 9. 'Jupiter' shrinkage of the embryo sac (46 d AFB), ×100; 10. 'Jupiter' aborting embryo (48 d AFB), ×100; 11. 'Jupiter' globular embryo (50 d AFB), ×200; 12. 'Jupiter' degenerating double embryo (50 d AFB), ×200; 13. 'Jupiter' empty embryo sac (50 d AFB), ×100; 14. 'Jupiter' deformed embryo sac (52 d AFB), ×100.

图1 “木星”胚、胚乳细胞学观察

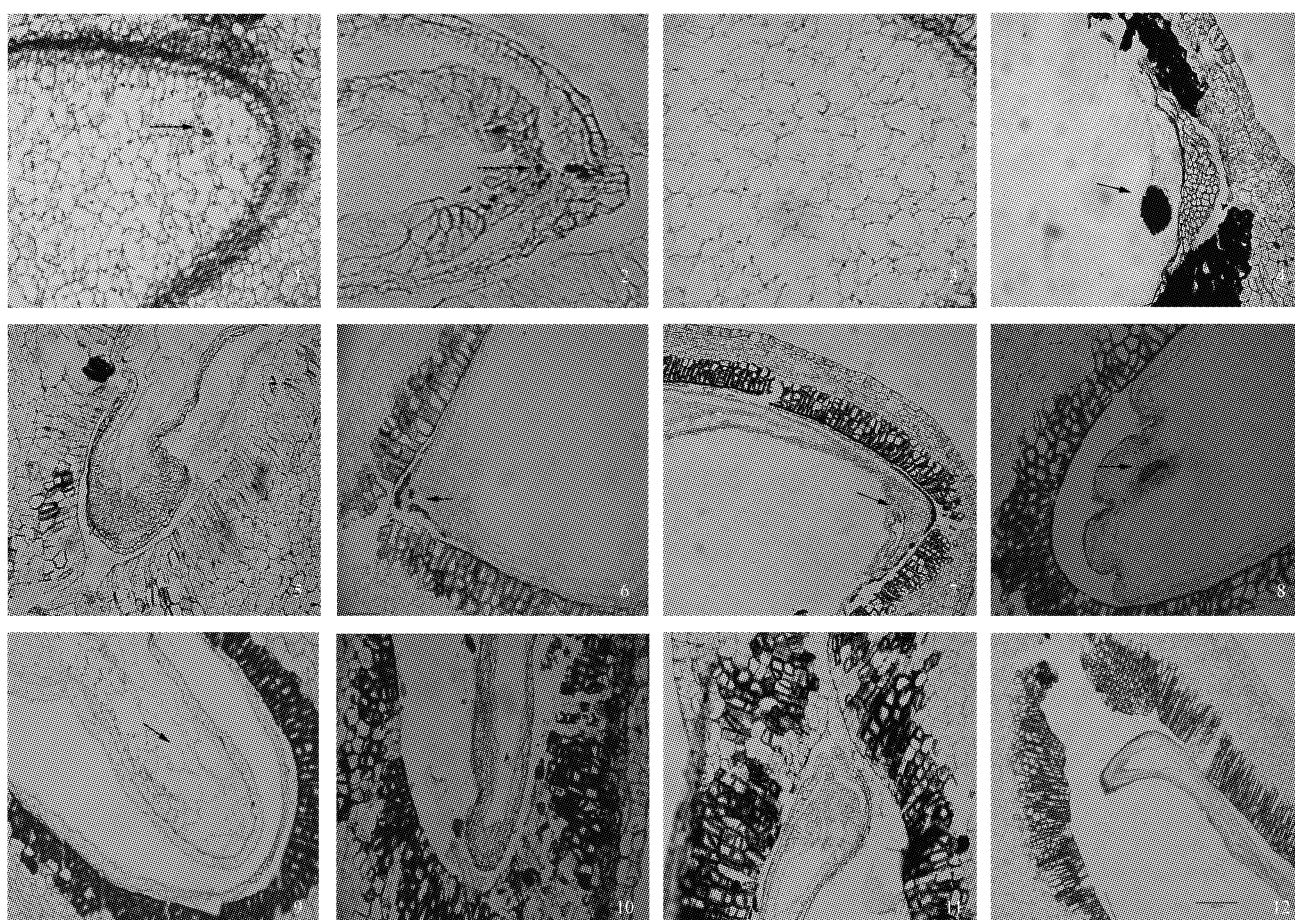
Fig.1 Cytological observation of 'Jupiter' embryo and endosperm

花后 34 d,可观察到多细胞原胚时期(图 1-2),胚的发育正常;花后 36 d,胚乳发育完全,充满胚囊(图 1-3),随后开始发生退化;花后 38 d,可观察到球形胚(图 1-4);花后 40 d,胚乳已经退化,此时观察到胚乳退化的形态(图 1-5);花后 42 d,胚开始退化,随着胚乳的皱缩,胚的位置也发生改变(图 1-6),与此同时,胚乳细胞的细胞质浓度下降,形态发生改变(图 1-7);花后 44 d,可观察到心形胚,此时胚开始败育(图 1-8);花后 46 d,可观察胚囊皱缩(图 1-9);花后 48~50 d,可观察到正在退化的胚(图 1-10),但是同时观察到极个别处于生长发育时期的胚(图 1-11),充分说明了同一品种的胚生长发育时期并不完全一致,在个别胚珠中发现了 2 个正在退化的胚(图 1-12),这表

明了无核葡萄胚生长发育的复杂性;在花后 50~52 d,可观察到中空的胚囊腔(图 1-13),此时胚乳、胚已经完全退化消失,在一些胚珠中,观察到了畸形的胚囊腔(图 1-14),这可能是由于胚乳细胞败育而使细胞结构发生异常而产生的。

## 2.2 “海王星”胚、胚乳败育的细胞学观察

“海王星”花后 30 d,可观察到核型胚乳,此时的胚正在发育阶段(图 2-1);花后 32 d,可以观察到小球形胚(图 2-2);花后 34 d,可观察到胚乳核细胞化(图 2-3);花后 36 d,可以观察到大球形胚(图 2-4),此时,胚的分化程度比较高,是进行离体培养的最佳时期;在花后 38 d,胚乳开始大量败育退化,可以观察到正在皱缩的胚囊



注:1.“海王星”花后 30 d,核型胚乳,多细胞原胚,×200;2.“海王星”花后 32 d,小球形胚,×200;3.“海王星”花后 34 d,胚乳细胞化,×200;4.“海王星”花后 36 d,球形胚,×200;5.“海王星”花后 38 d,退化的胚乳,×200;6.“海王星”花后 38 d,败育的胚,×200;7.“海王星”花后 40 d,退化的胚囊,×100;8.“海王星”花后 40 d,鱼雷形胚,×200;9.“海王星”花后 44 d,退化的胚,皱缩的胚囊,×200;10.“海王星”花后 42 d,皱缩的胚囊,×200;11.“海王星”花后 46 d,皱缩的胚囊,×200;12.“海王星”花后 48 d,中空的胚囊腔,×100。

Note:1. ‘Neptune’ endosperm, multicellular proembryo (30 d AFB), ×200; 2. ‘Neptune’ small globular embryo (32 d AFB), ×200; 3. ‘Neptune’ cellular endosperm (34 d AFB), ×200; 4. ‘Neptune’ globular embryo (36 d AFB), ×200; 5. ‘Neptune’ degenerating endosperm (38 d AFB), ×200; 6. ‘Neptune’ aborting embryo (38 d AFB), ×200; 7. ‘Neptune’ degenerating embryo and embryo sac (40 d AFB), ×100; 8. ‘Neptune’ torpedo-shape embryo (40 d AFB), ×100; 9. ‘Neptune’ degenerating embryo, wizened embryo sac (44 d AFB), ×200; 10. ‘Neptune’ shrinking of the embryo sac (42 d AFB), ×200; 11. ‘Neptune’ shrinking of the embryo sac (46 d AFB), ×200; 12. ‘Neptune’ empty embryo sac (48 d AFB), ×100.

图2 “海王星”无核胚、胚乳细胞学观察

Fig. 2 Cytological observation of ‘Neptune’ embryo and endosperm

(图 2-5),此时胚也开始发生败育,胚的形态结构发生改变(图 2-6);花后 40 d,可观察到正在败育退化的胚乳、胚,胚乳消失,胚囊腔形态结构发生改变,产生中空(图 2-7),此时,在一些胚珠内可以观察到鱼雷形的胚(图 2-8),虽然此时胚发育程度较高,离体培养的成活率较高,但仅在少数胚珠内观察到鱼雷期胚,并不是胚挽救接种的最佳时期;花后 42~48 d,胚发生不同程度的退化(图 2-9),胚乳逐渐消失退化,胚囊皱缩,最后留下中空的胚囊壳(图 2-10、2-11、2-12)。

### 3 讨论与结论

种子败育型无核葡萄相关的胚胎学报道较少,目前比较认可的是:合子胚在胚乳败育时也开始败育,只不过表现出胚乳细胞质浓度下降,细胞核退化,细胞壁也开始变薄,胚乳逐渐皱缩消失,胚的败育紧随其后<sup>[10]</sup>。另有学者认为无核葡萄杂种胚的败育主要是因为其遗传特性,表现在形态上主要有几点:杂交时授粉受精不良,胚珠发育不完全,胚珠腔中空;由于胚乳的皱缩消失,致使胚的发育失去营养供给而表现出败育;授粉受精后合子胚自身发育失常,导致其败育解体;珠心珠被部位发育受阻,致使整个胚珠发育异常,胚败育<sup>[11]</sup>。江淑平<sup>[8]</sup>研究了“火焰无核”、“大粒红无核”、“京可晶”胚乳、胚的生长发育过程,研究表明这 3 个无核葡萄品种都是胚乳败育先发生,胚后发生生长停止并解体,通过称取其在整个生长发育过程中的胚珠重量变化,进一步验证了胚乳先于胚发生败育,通过对培养后胚珠生长进行观察发现,在合适时期即最佳取样时期培养的胚珠,经过 8 周培养后,胚能保持发育正常,而自然状态下生长的胚早已解体消失,故胚的发育需要依赖胚乳提供养分,适宜时期取样对胚挽救培育无核葡萄至关重要。“火焰无核”的胚乳开始败育大概在盛花后 29 d,“大粒红无核”在花后 42 d,“京可晶”在花后 34 d。

无核葡萄胚挽救育种过程中,材料的取样时期制约着胚挽救效率,在适宜的时候进行取样离体培养,可以提高胚的发育率和成苗率。郭印山等<sup>[12]</sup>研究表明,影响胚挽救成苗率最重要的是胚珠的接种时间。不同材料的最佳取样时期不一致,需要进行大量的摸索。徐海英等<sup>[13]</sup>通过测定葡萄二倍体与四倍体种间杂交胚珠的重量变化,及解剖胚珠进行观察发现胚珠败育存在个体差异,其败育时期与母本相关。课题组研究人员经过多年的探索,已经确定了“波尔莱特”最佳取样时期是花后 55 d 左右,“红无籽露”为花后 51 d 左右,“皇家秋天”为花后 66 d 左右<sup>[14]</sup>。

关于无核品种“木星”、“海王星”的最佳取样时期,尚鲜见研究报道。该研究采用石蜡切片的方法观察了“木星”、“海王星”的胚珠内胚、胚乳的生长发育情况。研究表明“木星”、“海王星”整个胚珠的珠孔端与珠柄接近,

呈倒生型,这也是被子植物中最普遍的一种胚珠生长形态。胚和胚乳是植物双受精的产物,在植物生长中联系紧密,胚一般发育成独立生长的孢子体,胚乳作为一种特殊的营养物质,在植物生长初期或者后期被胚的生长分化所吸收,最终消失。通过对“木星”、“海王星”2 个无核葡萄品种的胚珠进行细胞学观察发现,二者都是胚乳发育完全之后,开始退化,随后胚开始发生退化败育,最终留下胚退化的痕迹,胚乳完全消失,留下中空的胚囊。其中“木星”在盛花后 36 d 可以观察到充分发育的胚乳,且花后 38 d 可以观察到球形胚,因此推断花后 38 d 左右是“木星”进行胚挽救取样的最佳时期。“海王星”在花后 36 d 可以观察到球形胚,花后 38 d 胚乳开始退化皱缩,因此推断“海王星”在花后 36 d 左右是进行胚挽救育种的最好取样时期。该结果与刘小宁<sup>[7]</sup>、江淑平<sup>[8]</sup>的研究结果相似,无核葡萄品种“木星”和“海王星”的胚和胚乳在胚珠生长发育的初期生长正常,随着胚生长到球形期、心形期时,胚乳发育充分,完全充满胚囊,但随后即开始皱缩退化,致使胚的生长受阻,出现败育。

无核葡萄品种“木星”、“海王星”胚开始发生败育的时期分别是花后 38 d 和 36 d,因此这 2 个时期分别是它们用作胚挽救母本时的最佳取样时期。

### 参考文献

- [1] JOHN R C, JAMES N M. Grapevine plant named Jupiter. US PP13, 309 P2[P]. University of Arkansas, Fayetteville, AR(Us), 2002.
- [2] JOHN R C, JAMES N M. Grapevine-Neptune cultivar. US PP12, 302 P2[P]. University of Arkansas, Fayetteville, AR(Us), 2001.
- [3] AMARAL A L, OLIVEIRA P R, CZERAINSKI A B, et al. Embryo growth stages on plant obtention from crosses between seedless grape parents [J]. Rev Bras Frutic, 2001, 23(3): 647-651.
- [4] 孟新法, 张利, 张璐生, 等. 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的影响[J]. 北京农业大学学报, 1992, 18(4): 393-396.
- [5] 潘学军, 李顺雨, 张文娥, 等. 种子败育型无核葡萄胚发育及败育的细胞学研究[J]. 西南农业学报, 2011, 24(3): 1060-1064.
- [6] RAMMING D W, EMERSHAD R L. Embryo culture of early ripening seeded grape (*Vitis vinifera*) genotypes[J]. Hortscience, 1990, 25: 339-342.
- [7] 刘小宁. 种子败育型无核葡萄胚珠、胚乳及胚发育的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.
- [8] 江淑平. 葡萄无核品种胚败育因子及其机理的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
- [9] 胡适宜. 被子植物胚胎学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1982: 177-185.
- [10] 张利, 孟新法, 张璐生, 等. 无核葡萄胚发育及早期离体培养的研究 II. 无核葡萄胚发育的特点[J]. 北京农业大学学报, 1991, 17(4): 55-59.
- [11] 王飞, 王跃进, 周会玲, 等. 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[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(3): 61-65.
- [12] 郭印山, 郭修武, 张海娥, 等. 葡萄二倍体和四倍体杂交胚挽救的影响因素[J]. 果树学报, 2006, 23(1): 115-117.
- [13] 徐海英, 闫爱玲, 张国军. 葡萄二倍体与四倍体种间杂交胚挽救取样时期的确定[J]. 中国农业科学, 2005, 38(3): 629-633.
- [14] 牛茹萱, 张剑侠, 王跃进, 等. 种子败育型无核葡萄胚挽救研究[J]. 北方园艺, 2012(7): 1-5.

# 蔬菜种苗床式有机基质高效 培育技术及效益

王忠红<sup>1</sup>, 关志华<sup>1</sup>, 陈双臣<sup>1,2</sup>

(1. 西藏大学 农牧学院, 西藏 林芝 860000; 2. 河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471000)

**摘要:**以林牧废弃物配制发酵的有机基质,用简易床式进行了多种蔬菜种苗的培育试验。结果表明:该方式适用于根系再生性能强的蔬菜作物;与容器育苗相比较,有效提高了基质的保水性,避免了容器育苗时的边际效应,保障了种子及幼苗的水分供给,使迟发芽种子得以正常发芽,提高了种子发芽率;有效改善了容器育苗时营养不足的问题,保障了种苗生长发育中的营养供给,且使种苗在不及时定植情况下能够有效生长发育;基质可重复利用,提高了基质利用率;无需育苗容器;总体上有效降低了育苗成本。

**关键词:**蔬菜种苗;基质;床式育苗;效益

**中图分类号:**S 604<sup>+</sup>.3 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)03-0035-04

壮苗是蔬菜获得优质高产的基础,目前生产中主要采用土壤和基质育苗,一些水培蔬菜也采用营养液育苗,因基质在透气性等方面优于土壤,基质育苗成为蔬菜壮苗培育的主要方式。在具体育苗过程中,穴盘和营

养杯又是主要的育苗载体,在育苗环境较好的情况下,这2种育苗载体均能获得优质壮苗。但如果育苗环境不够好,比如水分、光照管理跟不上,且种子发芽势较差时,会导致苗率不整齐。生产中要求番茄种苗具有一定花蕾,但穴盘因装载基质量有限,后期营养供应不上,不及时定植移栽则易使种苗后期脱肥,则往往难以培育壮苗;在设施内育苗时高温又易导致穴盘变形,影响育苗效果。营养钵对小粒种子如茄果类、叶菜类等蔬菜育苗时,则存在播种费时费力、占地、营养钵易风化等缺点。此外,容器育苗时一方面需要花钱购买育苗容器,另一

**第一作者简介:**王忠红(1980-),男,宁夏西吉人,硕士,副教授,现主要从事园艺植物种质资源创新利用与无土栽培等研究工作。  
E-mail:wzhong2008bj@126.com

**基金项目:**西藏重点科技资助项目(20137-3);西藏大学农牧学院柔性人才引进资助项目(201406)。

**收稿日期:**2015-09-22

## Cytological Study of Embryo and Endosperm Abortion in Two Seedless Grape Varieties

LIU Qiao, ZHANG Lihua, WANG Yuejin, ZHANG Jianxia

(College of Horticulture, Northwest Agriculture and Forestry University/State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas/Key Laboratory of Horticultural Plant Germplasm Resource Utilization in Northwest China/Ministry of Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** Stenospermocarpic seedless grape cultivars 'Jupiter' and 'Neptune' were taken as materials, using paraffin section technique and iron vitriol hematoxylin staining, cytological observation was performed on abortion and development of ovules, endosperms and embryos in 2 stenopermocarpic seedless grapes cultivars, so as to determine the best sampling time when the cultivars were used as the embryo rescue female parents. The result showed that the embryo of 'Jupiter' and 'Neptune' abortive began to occur when 38 days and 36 days after full bloom respectively. The optimal sampling time of 'Jupiter' and 'Neptune', which were as female parents of seedless grape embryo rescue were 38 days and 36 days after full bloom respectively.

**Keywords:** seedless grapes; embryo abortive; endosperm abortive; paraffin section; embryo rescue; sampling period