

红宝石无核胚珠败育的直观形态学研究

李 顺 雨¹, 潘 学 军¹, 张 文 娥², 刘 崇 怀³

(1. 贵州大学 喀斯特山地果树资源研究所, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学 农学院 贵州 贵阳 550025; 3. 中国农业科学院 郑州果树研究所, 河南 郑州 450009)

摘 要:以红宝石无核和谢花红为试材,系统研究花后不同时期胚珠败育数量、形态特征及不同时期胚珠的体积和重量变化。结果表明:2 个品种在胚珠发育前期都会因授粉受精不良引起部分胚珠发育不良,产生畸形胚珠,所不同的是红宝石无核花后34 d时畸形胚珠率急剧上升至81.48%,随后在较短时间内胚珠全部畸形,且这些畸形胚珠与前期授粉受精不良引起的胚珠畸形在外观形态上存在差异。与对照相比,红宝石无核的胚珠体积和重量也是在花后34 d达到顶峰,随后呈下降趋势,而谢花红胚珠体积及重量在46 d达到高峰,随后基本稳定。因此,花后34 d是研究和利用红宝石无核非常重要的时期。

关键词:无核葡萄;胚珠败育;直观形态
中图分类号:S 663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2009)04—0033—04

红宝石无核为美国葡萄育种学家 Harold Olmo 于 1968 年选育出的中晚熟鲜食无核品种,2001 年由国家农业部通过 948 项目引入我国,该品种果穗大、色泽鲜艳、品质好、耐贮藏,在新疆、陕西、宁夏、辽宁、河南、山东等地均有栽培^[1],且为无核葡萄新品种选育的重要亲本^[2-4],但由于该品种存在胚败育现象,在以红宝石无核作为母本的杂交种中,必须通过胚挽救技术才可获得杂种苗。目前,关于红宝石无核胚败育方面的研究报道较少^[2-4],且这些报道多集中于胚挽救接种时间及培养基差异对红宝石无核成苗率的影响方面,对于直观形态学方面的报道较为欠缺。现以红宝石无核为试材,于花后不同时期取材,从胚珠颜色、大小、重量等直观形态学方面进行研究,旨在揭示红宝石无核胚珠败育前后的直观形态变化,以期通过直观形态变化确定红宝石无核胚败育时期,为无核葡萄胚挽救育种提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

第一作者简介:李顺雨(1981-),男,河南周口人,在读硕士,研究方向为果树栽培与生理生态。E-mail: lishunyu1981@163.com。
通讯作者:潘学军(1977-),男,山东临沂人,博士,副教授,研究方向为果树种质资源与生物技术育种。E-mail: pxjun2050@yahoo.com。
基金项目:贵州省自然科学基金资助项目(黔科合J字 2006-2043);贵州大学人才科研资助项目(贵大人基合字 2006-700971301);贵州省果树学科科技创新人才团队建设资助项目(黔科合人才团队(2008)88007号);贵州省特色农业产业人才培养基地建设资助项目;贵州省果树工程技术研究中心建设资助项目(黔科合农G字 2007 4001号)。
收稿日期:2008-12-27

以自交的红宝石无核和有核品种谢花红为试材,取自国家果树种质郑州葡萄圃。试验于 2007 年 4 月至 2008 年 8 月在贵州大学果树科学实验室及中国农科院郑州果树所葡萄资源实验室进行。

1.2 试验方法

1.2.1 取材 选取生长健壮、无病虫害、长势基本一致的植株,花前 1 周进行摘心、抹副梢、修整花序、套袋、绑蔓、挂标签。分别于花后 16~58 d 每 6 d 取 1 次样,具体方法为在取样植株上、中、下部的不同方位、不同果穗及果穗不同部位随机取发育正常的果实,每次 200 粒左右(具体取材数量根据实际情况而定),贮于冰袋箱中,带回实验室,放入 0℃~4℃冰箱备用。

1.2.2 直观形态学观察 随机取 10 粒果实,剥离胚珠后立即对胚珠形状、大小一致性、颜色等外观性状进行描述;然后,统计其胚珠总数、畸形胚珠总数(体积偏小或发育不对称)、正常胚珠总数,并计算百分率。随机选取 20 枚胚珠,称量鲜重;再随机取 10 枚分别用游标卡尺测量其纵、横径,计算胚珠大小(纵径×横径)^[5],并求平均值。

1.2.3 数据分析 结果经 Excel 处理后,运用 DPS 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同发育时期胚珠败育数量分析

供试的 2 个葡萄品种均为二倍体,子房为 2 心室 4 胚珠类型。如果每个胚珠都正常发育,将产生 4 粒种子。但葡萄种子发育过程中由于各方面的原因,特别是营养竞争的原因,导致一些种子发育中途停止,出现败育,因此即使是有核葡萄品种果实内种子数目也存在差异。该试验对 2 个葡萄品种果实内胚珠的数量变化进

表 1 不同时期胚珠直观形态的统计

Table 1		The statistics of macroscopic morphology in different developmental stages for ovules							
品种 Cultivar	测定指标 Index	16 d	22 d	28 d	34 d	40 d	46 d	52 d	58 d
红宝石无核 Ruby seedless	胚珠总数/个	30	37	31	27	29	30	30	34
	畸形胚珠数/个	9	12	12	22	26	30	29	34
	畸形胚珠百分率 %	30.00	32.43	38.71	81.48	89.65	100.00	96.67	100.00
	正常胚珠数/个	21	25	19	5	3	0	1	0
	正常胚珠百分率 %	70.00	67.57	61.29	18.52	10.34	0	3.33	0
谢花红 Mascot mathiasc janosne	胚珠总数/个	37	33	28	32	37	35	34	37
	畸形胚珠数/个	12	11	11	12	6	7	6	8
	畸形胚珠百分率 %	32.43	33.33	39.29	37.50	16.22	20.00	17.65	21.62
	正常胚珠数/个	25	22	17	20	31	28	28	29
	正常胚珠百分率 %	67.57	66.67	60.71	62.5	83.78	80.00	82.35	78.38

行了研究, 结果如表 1 所示。

2 个葡萄品种均存在畸形胚珠现象, 但二者畸形胚珠数量的变化趋势不同(表 1)。红宝石无核随着胚珠的不断发育, 其畸形胚珠总数及百分率呈阶段性递增趋势, 在花后 16 ~ 28 d 之间, 其胚珠畸形率在 30% ~ 40%; 而在 34 d 取材时, 其胚珠畸形率达到了 81.48%, 此后在极短时间内(花后 46 d), 胚珠全部畸形(或败育), 只有极个别的胚珠还会出现短时间的存活, 如从 46 ~ 58 d 的 3 次取样中仅在 52 d 时发现了一个正常胚珠。而谢花红的胚珠畸形率前期处于一个较为稳定的水平(30% ~ 40%), 到花后 40 d 以后, 畸形率降至 20% 左右。因此, 可以推断红宝石无核和谢花红前期出现的胚珠畸形的主要原因是授粉受精不良所致, 因为在自花授粉条件下, 其授粉受精的概率相差无几, 因此其胚珠畸形率也相差不大, 也正是授粉受精不良引起胚珠畸形而导致胚珠败育, 从而使葡萄果实内种子败育 1 ~ 4 粒不等。红宝石无核授粉受精不良引起的胚珠败育还未完全结束时, 已经受精的胚珠由于胚珠内各部分发育的不协调性, 导致了胚珠第二次败育高峰的出现, 这种不协调性导致的胚败育范围更广泛, 致使红宝石无核胚珠败育率最终会达到 100%。而有核品种谢花红后期不存在遗传因素决定的胚败育, 随着果实的膨大授粉受精不良的胚珠可能部分会消失, 所以导致畸形胚珠比率略有下降, 正常发育胚珠比例略有上升并趋于稳定。

2.2 胚珠败育的直观形态特征

2 个葡萄品种胚珠授粉受精不良和胚珠内各部分发育不协调均可导致胚珠败育, 通过观察发现 2 种原因导致的败育在胚珠颜色、胚珠大小、胚珠的形态等各个方面存在差异(表 2)。花后 28 d 以内取材的红宝石无核和所有时期取材的谢花红败育型胚珠与正常胚珠相比主要差异是颜色偏淡, 体积较小。而 34 ~ 58 d 取材的红宝石无核其败育型胚珠与正常胚珠相比不仅体积较小, 颜色偏淡, 而且出现发育不对称现象, 特别是在核沟、种脊两侧这种不对称现象表现得更为明显。而且随着果实

的不断发育, 其不对称现象越来越明显。解剖胚珠发现花后 40 d 红宝石无核正常胚珠的胚乳基本表现为正常的晶体状, 畸形胚珠的胚乳明显呈糊状, 而到花后 46 d 时, 畸形胚珠的胚乳基本已经皱缩; 花后 52 d 畸形胚珠的胚乳多数出现穿孔现象, 到花后 58 d 畸形胚珠内只能看到胚乳痕。由此可见, 胚乳发育中途停止是导致红宝石无核胚珠及胚败育的一个重要原因, 因为红宝石无核胚的生长依赖胚乳提供养料, 尤其是胚的早期发育阶段(从合子到球形胚), 所以胚乳败育导致胚的生长发育缺乏养料而败育, 同时, 胚珠表现畸形或败育。结合红宝石无核花后 34 ~ 58 d 胚珠畸形率急剧上升、且趋向 100% 的事实可知, 花后 34 d 是胚珠败育的始期, 花后 40 d 是胚珠大量败育的时期, 花后 46 ~ 58 d 其胚珠已基本全部败育。

2.3 不同发育时期胚珠重量及体积的变化

为了更加客观说明无核葡萄和有核葡萄在种子发育过程中的变化, 对 2 个葡萄品种不同发育时期的胚珠重量和体积进行测定, 结果见图 1。对于种子败育型无核葡萄红宝石无核胚珠的纵径、横径、体积及鲜重均在花后 34 d 达到顶峰, 而后逐渐降低; 有核品种谢花红胚珠的纵横径、体积及鲜重前期都呈上升趋势, 其顶峰出现在花后 46 d, 其后该品种胚珠的体积及重量基本趋向稳定, 变化不大, 方差分析后发现达不到显著性差异。说明在田间自花授粉条件下, 红宝石无核胚珠发育到一定阶段会停止正常发育, 随后畸形胚珠各部呈现不对称性发育, 畸形胚珠纵横径、体积及重量逐渐下降, 其种腔逐渐空瘪。谢花红多数胚珠(80% 左右)正常发育, 且趋向成熟种子固有的形态; 正常胚珠外部由黄绿变黄褐, 再由黄褐到褐, 其纵横径、体积及重量基本趋向稳定(花后 46 d 以后)。结合胚珠败育数量分析及直观形态特征可知, 胚珠畸形或败育与其纵横径、体积及重量有一定的关系, 即纵横径、体积及重量达到最大值后 1 周左右是其胚珠及胚乳开始大量败育的时期, 此可以作为胚挽救的重要参考。

表 2 不同时期胚珠败育的直观形态特性

Table 2 The macroscopic morphology of both development and abortion were described in different developmental stages for ovules	
花后时间	红宝石无核 Ruby seedless 谢花红 Mascat mahiase janosne
16 d	胚珠浅黄绿色, 呈透明或半透明状。畸形胚珠偏黄白色 体积偏小, 约是正常胚珠(2.2 × 1 mm²)的 1/4~1/2 正常胚珠体积约为 4.0×2.0 mm², 浅黄绿色, 畸形胚偏黄白色, 体积偏小
22 d	正常胚珠体积约为 3.1×1.3 mm², 黄绿色; 畸形胚珠偏黄白色 体积偏小 正常胚珠体积约为 4.8×2.5 mm², 黄绿色; 畸形胚珠偏黄白色, 体积偏小
28 d	正常胚珠体积约为 3.6×1.5 mm², 黄绿色; 畸形胚珠黄白色 呈透明或半透明状 体积约是正常胚珠的 1/4~1/2 正常胚珠约为 5.1×3.0 mm², 呈现浅黄褐色斑纹, 喙部较明显; 畸形胚珠表现同红宝石无核 28 d
34 d	正常胚珠体积约为 4.1×2 mm², 黄绿色; 畸形胚珠浅黄绿色或黄白色 其珠被局部发育不一致, 呈轻微凹陷或凸起, 或种脊、核沟两侧发育呈轻微不对称, 其核洼、核沟、合点分化不明显, 其体积相对较小 正常胚珠体积约为 5.5×3.3 mm², 浅黄褐色斑纹增多, 喙部明显。畸形胚珠浅黄绿色或黄白色, 体积偏小
40 d	正常胚珠体积约为 4.1×1.9 mm², 黄绿色; 畸形胚珠浅黄绿色 珠被局部凹陷或凸起或种脊及核沟两侧发育不对称明显 其体积相对正常胚珠偏小或相当; 解剖胚珠, 多数胚乳呈糊状 少数呈晶状 正常胚珠体积约为 6.0×3.4 mm², 浅黄褐色, 喙部及合点两侧黄褐色 缝合线及合点部位黄绿色或黄白色。畸形胚珠同谢花红 34 d
46 d	畸形胚珠浅黄绿色, 未发现正常胚珠; 个别畸形胚珠体积约 4.1×1.8 mm²; 多数畸形胚珠, 其外观基本同红宝石无核 40 d 体积偏小; 解剖胚珠后发现多数胚乳为皱缩状 正常胚珠体积约为 6.2×3.5 mm², 黄褐色, 喙部褐色较重, 缝合线及合点部黄绿色或黄白色。畸形胚珠同谢花红 34 d
52 d	畸形胚珠浅黄绿色, 个别畸形胚珠体积约为 4.1×1.7 mm²; 部分畸形胚珠喙部或珠被上出现黄色斑点; 多数畸形胚珠, 畸形表现比红宝石无核 46 d 明显, 其体积偏小; 解剖胚珠, 多数胚乳片状皱缩、穿孔 正常胚珠体积约 6.1×3.4 mm², 黄褐色加重 其它方面同谢花红 46 d。畸形胚珠同谢花红 34 d
58 d	畸形胚珠浅黄绿色或浅黄褐色; 胚珠基本全部畸形, 且畸形表现较红宝石无核 52 d 明显, 其体积较红宝石无核 52 d 下降 解剖的胚珠多数仅有胚乳残痕 正常胚珠体积约为 6.2×3.4 mm², 基本呈褐色 其种沟、种脐、种脊、核凹及喙部明显。畸形胚珠同谢花红 34 d

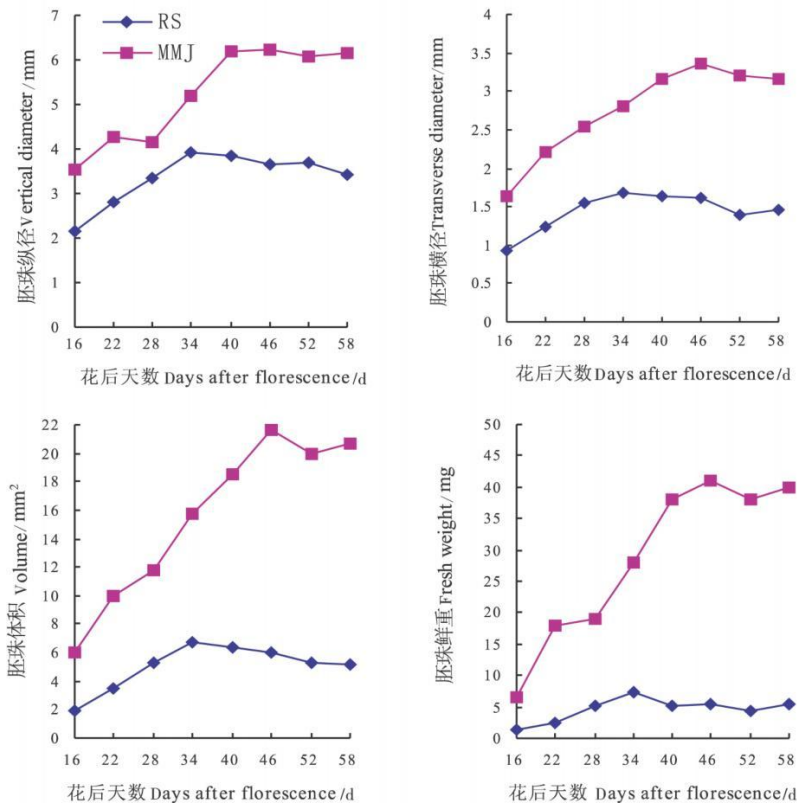


图 1 不同发育时期的胚珠纵横径、体积及鲜重

Fig. 1 The vertical diameter, transverse diameter, volume and fresh weight of ovules in different developmental stages.

3 讨论与结论

3.1 胚珠败育的直观形态学机理

目前,植物胚败育的研究已有较多报道^[6-9],在无核葡萄胚败育的细胞学机理方面,前人已作了初步探索^[10-12],大致认为胚珠发育到一定阶段,其鲜重会下降(胚乳开始败育),胚乳败育后,胚因缺乏营养也随之败育。该试验研究发现红宝石无核、谢花红2个葡萄品种均存在一定的胚珠败育现象,2个品种胚珠的前期败育原因都是由于授粉受精不良引起的,此后谢花红的胚珠畸形率略有下降;而红宝石无核在授粉受精不良导致的败育未完全结束时,由遗传因素主导的胚珠内各部分的发育不协调又导致了胚珠的败育,特别是胚乳的解体引起了胚珠及胚的败育。从胚珠形态特性来看,授粉受精引起的败育胚珠仅在胚珠颜色及体积上与正

常胚珠差异明显,而不存在很明显的形态差异;而红宝石无核后期的胚珠发育不协调导致的胚珠败育则不仅在颜色和体积上有差别,而且其胚珠发育出现了严重的不对称现象,且随着果实的不断发育,不对称现象会越来越明显,特别是在种脊及核沟等部位,而且这些败育胚珠的核洼、核沟、合点分化也变得不明显,到最后胚珠内的胚乳和胚均发生解体,胚珠就成了一个皱缩的空腔。不管是畸形胚珠的数量、体积和重量变化,还是败育胚珠的外观特征变化,其在发育历程上的转折点都是在花后 34 d 出现,因此,花后 34 d 是研究和利用红宝石无核非常重要的时期。表观形态学研究是一种最直观的方法,由此可知,胚珠纵横径、体积、鲜重、颜色、胚乳状态等直观形态的变化与胚珠的畸形或败育关系密切;同时,胚珠直观形态的变化具有直接、简便、快捷的特点,所以其可以作为胚挽救的重要参考。

3.2 胚挽救时期的确定

确定胚珠接种的最佳时间,是其胚挽救成功的前提^[13]。许多研究认为,最佳取样时期应该在胚发育程度较高、即将败育的时期,也有研究者认为应在花后 40~55 d;但不同品种存在较大的差异,因此寻找一种准确、可靠的方法来确定胚挽救的取样时期是很有必要的。该试验系统研究红宝石无核的胚珠外观形态学,结果显示红宝石无核胚珠的发育及败育与胚珠纵横径、体积、鲜重、外观颜色等联系紧密,红宝石无核胚珠纵横径、鲜重、体积在花后 34 d 均达到最大值,该时期畸形胚珠率也达最大值,同时细胞学观察发现花后 40 d 红宝石无核胚珠及胚乳开始大量败育,其珠被内基本为糊状胚乳,所以此时期(花后 40 d 左右)应该是红宝石无核进行胚挽救的最佳时期,即胚珠纵横径、体积、鲜重达到最大值

及畸形胚珠百分率明显上升后 1 周左右,此与郝燕^[2]的试验结果红宝石无核在胚珠发育 45 d 为最佳取胚时间较相近。

参考文献

- [1] 孔庆山. 中国葡萄志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [2] 郝燕, 王发林, 杨瑞等. 无核葡萄胚败育时期的确定及接种时间对胚萌发的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2006, 11(4): 45-48.
- [3] 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.
- [4] Nicole H O, Jorge Valenzuela B, Carlos M S. Cultivar effect in the development of stenospermocarpic grape embryos cultured in vitro[J]. Agricultura Técnica (Chile), 2006, 66(2): 124-132.
- [5] 蒋爱丽, 李世诚, 杨天仪, 等. 无核葡萄胚败育进程研究[J]. 上海农业学报, 2008, 24(2): 46-49.
- [6] Ramming D W, Emershad R L, Taraito R A. Stenospermocarpic seedless *Vitis vinifera* × *Vitis rotundifolia* hybrid developed by embryo rescue[J]. Hortscience, 2000, 35(4): 732-735.
- [7] Chen W, Lu L X. Relationship Between Lichi Embryo Abortion and Phenolic Inhibitors[J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(2): 168-172.
- [8] Cain D W. In-ovule embryo culture and seedling development of seeded grape *Vitis vinifera* L. [J]. Vitis, 1983, 22, 9-14.
- [9] Agüero C, Vigliocco A, Abdala G, et al. Effect of gibberellic acid and uniconazole on embryo abortion in the stenospermocarpic grape cultivars Emperor and Perla[J]. Plant Growth Regulation, 2000, 30: 9-16.
- [10] 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, 2005, 33(30): 61-65.
- [11] 刘小宁, 王跃进, 张剑侠, 等. Flame seedless 葡萄胚珠、胚乳及胚发育与败育的研究[J]. 西北植物学报, 2005, 25(10): 1947-1953.
- [12] 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, 17(10): 1987-1993.
- [13] Yang D L, Li W, Li S. In vitro embryo rescue culture of F1 progenies from crosses between diploid and tetraploid grape varieties[J]. Plant Growth Regulation, 2007, 51: 63-71.

Study on Macroscopic Morphology of Ovule Abortion in ‘Ruby Seedless’

LI Shun-yu¹, PAN Xue-jun¹, ZHANG Wen-e², LIU Chong-huai³

(1. Research Institute for Fruit Resource of Karst Mountain Region, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 2. Agricultural College of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 3. Zhengzhou Fruit Research Institute, China Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450009, China)

Abstract: Took ‘Ruby Seedless’ and ‘Muscat Mathias Janosne’ as materials, abortive number, morphological character, volume and fresh weight of ovules in different developmental stages were researched systematically in this paper. The results showed that there were abnormal ovules in both seedless and seeded cultivar in prophase of ovule development, which was resulted from mal-pollination and mal-fertilization. The differences of between seedless and seeded cultivar was that abnormal ovules numbers of ‘Ruby Seedless’ increased rapidly to 81.48% on 34 d after florescence and after then in short period all ovules were abnormal. At the same time the abnormality was different from abnormality resulted from mal-pollination and mal-fertilization in macroscopic morphology. Compared with ‘Muscat Mathias Janosne’, the peak value of ovules’ volume and fresh weight was 34 d after florescence in ‘Ruby Seedless’ and then began to decreasing gradually, however, it was 46 d of ‘Muscat Mathias Janosne’ after florescence and after time it was no visible change. So it was a very important stage to research and utilize ‘Ruby Seedless’ that was 34 d after florescence.

Key words: Seedless grape; Ovule abortion; Macroscopic morphology