

葡萄胚胎发育与败育过程中胚珠的多胺含量变化

郭印山, 郭修武*, 张海娥

沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110161

提要: 花后 40~60 d 期间, 种子败育型无核葡萄胚珠的 3 种多胺含量明显低于有核葡萄, 据此认为无核葡萄胚珠中多胺含量急剧下降和较低的多胺水平可能是导致葡萄胚胎败育的重要原因。(Spd+Spm)/Put 和 Spm/PAs 比值变化与葡萄胚胎发育密切相关, 较低的比值不利于胚胎的正常分化。

关键词: 葡萄; 胚珠; 多胺; 胚胎发育; 胚胎败育

Changes in Polyamine Contents of Ovules during Grape (*Vitis vinifera* L.) Embryo Development and Abortion

GUO Yin-Shan, GUO Xiu-Wu*, ZHANG Hai-E

College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

Abstract: This study was carried on the changes in polyamine contents of ovules during grape embryo development and abortion. The results showed that three kinds of polyamine in seedless grape ovules were obviously lower than those of seeded grape ovules in 40-60 d after anthesis. The quick decrease and lower level of polyamine contents in seedless grape ovules might be the important factor that caused grape embryo abortion. The ratios of (Spd+Spm)/Put and Spm/PAs closely related with grape embryo development, and low ratio was disadvantageous to embryo differentiation.

Key words: grape (*Vitis vinifera*); ovule; polyamine; embryo development; embryo abortion

无核葡萄是国际上葡萄生产和消费的重要发展方向, 因此, 无核葡萄的育种遂成为当今葡萄育种的主要目标。在无核葡萄育种中, 人们采用胚挽救技术取得了重大进展, 但关于种子败育型无核葡萄胚败育机制的研究却少有报道, 查明其胚败育机制, 将有助于提高无核葡萄的育种效率, 同时对葡萄的无核化生产也有一定的指导意义。长期以来, 葡萄胚胎发育与败育的研究大多集中于细胞学的观察与描述, 而对其中生理生化机制的研究较少。多胺是一类植物生理活性物质, 与细胞分裂、开花结果、胚胎发育、生长和休眠以及衰老等生命活动密切相关(周俊义 1995; Shoeb 等 2001)。多胺和植物胚胎发育与败育关系在水稻(郭枫和唐锡华 1990)、玉米(张凤路等 1999)、荔枝(陈伟和吕柳新 2000)、龙眼(梁文裕和陈伟 2005)和体细胞胚(崔凯荣和戴若兰 2000)研究中已多有报道, 但在葡萄胚胎败育中尚未见报道。为此, 本文以胚胎发育状况不同的 2 个葡萄品种为试材, 检测其在胚胎不同发育阶段

的胚珠中多胺含量变化, 探讨多胺与葡萄胚胎发育及败育的关系。

材料与amp;方法

葡萄(*Vitis vinifera* L.)品种为‘巨峰’(胚胎发育正常)和‘金星无核’(假单性结实型), 种植在本校葡萄试验园内, 选用生长和结果正常的五年生、花期基本一致的植株各 5 株。于盛花后, 每隔 10~15 d 采集发育正常的果实, 立即在低温下剥离胚珠; ‘金星无核’的胚珠于花后 50 d 进行胚挽救培养, 取培养 30 和 60 d 的发育胚珠, 以液氮处理后保存于 -70 °C 低温冰箱中, 测定前于 -50 °C 下真空冻干, 粉碎后作测定用。

内源多胺的提取及测定参照王广鹏等(2005)文

收稿 2006-09-18 修定 2007-01-04

资助 辽宁省自然科学基金(20032085)和沈阳农业大学青年教师科研基金(200426)。

*通讯作者(E-mail: guoxw1959@163.com; Tel: 024-88487147)。

中的方法并加以改进。具体方法是:称取100 mg 细样粉,置于10 mL离心管中,加入4 mL预冷的5%高氯酸,加冰后以超声波仪(300 W, 28 kHz)超声10 min,并于冰浴中浸提1 h后,于4 °C下以16 099.2×g离心30 min。取0.5 mL上清液放入另1支10 mL离心管中,加入7 μL苯甲酰氯,再加入1 mL 2 mol·L⁻¹的NaOH,涡旋混合30 s,放在37 °C水浴锅中酰化20 min。酰化液分别加入2 mL饱和NaCl溶液和2 mL乙醚,震荡后再以16 099.2×g离心5 min。取1.5 mL醚相于DNA浓缩仪中干燥(约15 min)。用400 μL流动相涡旋溶解后过0.45 μm滤膜,取10 μL进样。以Waters 510高效液相色谱仪测定,条件为:Luna C₁₈柱,250 mm×4.6 mm; Waters 2487紫外检测器,检测波长230 nm的变化;流动相为甲醇:水(60:40, V/V),流速1.0 mL·min⁻¹。N2000色谱工作站(浙江大学)采集处理数据,外标法保留时间定性。腐胺(Put)、亚精胺(Spd)和精胺(Spm)标准样品购自Sigma公司,以酰化后的样品绘制标准曲线。样品由河北农林科学院昌黎果树研究所测定。

实验结果

1 葡萄胚胎发育过程中胚珠的多胺含量变化

从表1可以看出,(1)‘巨峰’在花后10 d的多胺含量达到顶峰,以后急剧下降,花后40 d左右又有一个高峰,之后平稳下降,果实成熟时下

降至最低。‘金星无核’葡萄在花后即急剧上升,花后20 d的多胺总量达到高峰,之后下降,花后30~40 d的下降幅度最大,50~60 d期间稳定在较低水平上。这些显示在胚珠发育前期,无核葡萄与有核葡萄都有一个多胺含量的快速增长过程,‘巨峰’到达顶峰的时间早于‘金星无核’。并且有核葡萄‘巨峰’在花后40 d左右的多胺含量有一个回升,而无核葡萄‘金星无核’则无。从花后40 d以后,‘巨峰’的多胺总量远远高于‘金星无核’,为其3~3.38倍。但后者以胚珠培养之后,其多胺总量大大上升,可与前者相当。

(2)从Put含量来看,在花后10 d,‘巨峰’胚珠内含量极低,甚至检测不到,10 d以后缓慢上升,花后40 d时含量达到最高,之后下降,花后75 d又有回升。而‘金星无核’Put含量在花后20 d急剧升高至顶峰,之后又急剧下降,花后60 d时达到最低水平。花后30 d,‘巨峰’胚珠中Put含量低于‘金星无核’,之后‘巨峰’胚珠中Put含量则高于‘金星无核’。

(3)‘巨峰’Spd含量在花后10 d即达到最高,之后急剧下降,40 d时又小幅回升,后又缓慢下降。而‘金星无核’Spd含量则到花后20 d达到最高,并延续到花后30 d,之后急剧下降,花后60 d时达到最低水平。

(4)‘巨峰’胚珠中Spm含量初期极低,接着上升,花后30 d到达顶峰后再缓慢下降。前

表1 葡萄胚胎发育过程中胚珠的多胺含量变化

Table 1 Changes in polyamine contents of ovules of grape during grape embryo development

多胺	品种	花后时间/d							
		10	20	30	40	50	60	75	100
Put	‘巨峰’	—	2.24	2.24	2.72	1.26	1.44	4.16	—
	‘金星无核’	2.72	13.12	8.96	1.76	1.12	0.96	2.40*	3.20**
Spd	‘巨峰’	38.24	2.88	2.40	4.64	2.08	1.44	1.76	0.48
	‘金星无核’	4.64	12.32	12.00	1.28	0.80	0.80	1.44	2.08
Spm	‘巨峰’	—	3.36	4.32	4.00	3.52	2.88	0.80	—
	‘金星无核’	3.36	4.64	0.71	0.32	0.16	0.16	1.44	2.24
PAs	‘巨峰’	38.24	8.48	8.96	11.36	6.86	5.76	6.72	0.48
	‘金星无核’	10.72	30.08	21.67	3.36	2.08	1.92	5.28	7.52

* 和** 为‘金星无核’胚挽救培养30和60 d的胚珠。

期‘金星无核’Spm含量变化趋势与‘巨峰’相似,花后20 d达到顶峰,之后持续下降,下降幅度远大于‘巨峰’。

总之,无核葡萄胚珠在适宜时期经过胚挽救培养后,能够显著增加3种多胺含量及多胺总量,达到与有核葡萄相近的水平。在花后40 d前后,无核葡萄‘金星无核’胚珠中3种多胺含量均急剧下降,之后含量远低于有核葡萄‘巨峰’。一般来说,此期是葡萄胚胎发育的关键时期,说明多胺与葡萄胚胎发育密切相关,多胺含量急剧下降可能是胚胎败育的原因。

2 葡萄胚胎发育过程中胚珠的2种多胺比值变化

图1和图2显示:葡萄胚珠发育的第20~60天,(Spd+Spm)/Put和Spm/PAs的2个比值均是胚胎发育正常者‘巨峰’大于胚胎败育者‘金星无核’,无核葡萄经胚挽救培养后,Spm比例也得到显著提高。因此,说明两者比值变化可能与葡萄胚珠发育密切相关,两者比值高有利于胚珠发育,反之则不利于胚珠发育。

讨 论

一般来说,葡萄合子形成后而进入休眠,在盛花后15~20 d开始分裂,形成原胚,之后经历多细胞胚、球形胚、心形胚、鱼雷形胚阶段,最后发育为成熟胚(董晓玲1990;王晶和罗国光1996)。假单性结实无核葡萄胚的早期发育与有核葡萄经历相同的胚发育阶段,但在发育中途则因

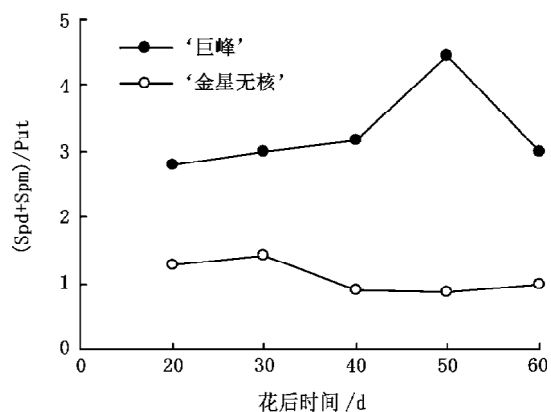


图1 葡萄胚胎发育过程中胚珠的(Spd+Spm)/Put比值变化
Fig. 1 Change in (Spd+Spm)/Put ratio of ovules during grape embryo development

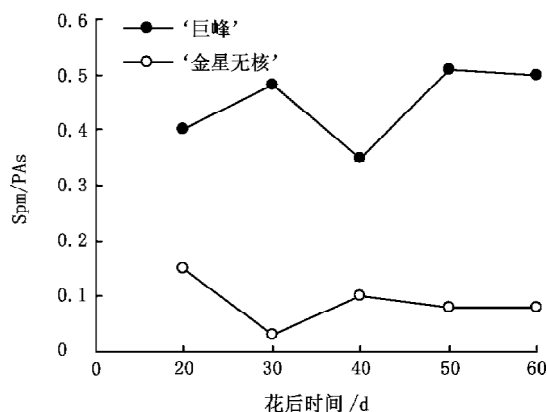


图2 葡萄胚胎发育过程中胚珠的Spm/PAs比值变化
Fig. 2 Change in Spm/PAs ratio of ovules during grape embryo development

遗传或生理原因停止发育而败育。本文结果表明,在胚胎发育前期,‘巨峰’与‘金星无核’葡萄胚珠中多胺含量都出现一高峰,显示较高含量的多胺可能促进葡萄胚胎的发生与发育;也说明假单性结实型无核葡萄的胚胎早期发育是正常的。但在花后30~40 d,‘巨峰’葡萄胚珠中多胺含量有一个回升过程,而‘金星无核’则无,之后‘巨峰’胚珠中的3种多胺含量和多胺总量都高于‘金星无核’。这正是葡萄果实发育的第二时期开始,胚胎加速发育,种皮硬化,有核葡萄‘巨峰’胚珠中的高含量多胺对胚、胚乳和种皮的分裂以及发育可能有促进作用。

多胺比值变化在胚胎发育过程中也有意义。陈伟和吕柳新(2000)报道,在荔枝败育胚珠中,尤其是在胚胎败育期间,Spd和Spm含量的下降速度比正常胚珠快得多,(Spd+Spm)/Put和Spm/PAs比值都最低。梁文裕和陈伟(2005)在龙眼败育胚珠中也见到相似的现象。本文中花后20~60 d期间,‘巨峰’胚珠中(Spd+Spm)/Put和Spm/PAs比值远高于‘金星无核’胚珠,这显示较低的多胺比值不利于胚胎的正常分化,因而导致无核葡萄胚胎败育。据此认为,葡萄胚胎的正常分化是各种多胺之间相互作用和动态平衡之果。

参考文献

- 陈伟, 吕柳新(2000). 荔枝胚珠中多胺含量变化与胚胎发育的关系. 热带亚热带植物学报, 8 (3): 229~234
崔凯荣, 戴若兰(2000). 植物体细胞胚发生的分子生物学. 北京:

科学出版社

- 董晓玲(1990). 葡萄胚珠、胚乳及胚的发育. 植物学通报, 7 (1): 53~55
- 郭枫, 唐锡华(1990). 水稻胚与胚乳分化发育中的内源多胺. 植物生理学报, 16 (2): 173~178
- 梁文裕, 陈伟(2005). 龙眼胚珠多胺含量变化与胚胎发育的关系. 应用与环境生物学报, 11 (3): 286~288
- 王广鹏, 张新忠, 常瑞峰, 李春敏, 束怀瑞(2005). 葡萄实生树阶段转变过程中的内源多胺含量变化. 植物生理学通讯, 41 (2): 181~182

- 王晶, 罗国光(1996). 巨峰葡萄胚和胚乳的发育. 园艺学报, 23 (2): 191~193
- 张风路, 王志敏, 赵明, 王树安, 赵久然, 郭景伦(1999). 多胺与玉米籽粒败育关系研究. 作物学报, 25 (5): 565~568
- 周俊义(1995). 多胺在果树生理中的作用. 果树科学, 12 (2): 117~119
- Shoeb F, Yadav JS, Bajaj LS, Rajam MV (2001). Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. Plant Sci, 160: 1229~1235