

Pollen Haploid Plants Cannot Be Induced from Grape Anther Culture

Ziyi Cao^{1,2}

¹College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou

²Agriculture Science Committee, the Senior Professor Association of Gansu Province, Lanzhou

Email: caozy@gsau.edu.cn

Received: May 26th, 2014; revised: Jun. 24th, 2014; accepted: Jul. 1st, 2014

Copyright © 2014 by author and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Based on the literature and his own research experiences, the author presented and discussed the academic point on induction and culturing of grape pollen haploid plants. Upon the only one paper reporting that whole grape plants were induced from anther culture, the author listed six evidences, including cytology, plant morphology and genetics, to clarify that the so-called haploid plants were still diploid plants. Finally, the author proposed that the grape anther culture cannot induce the pollen haploid plants according to the existing technology. At the same time, the issue about the induction of pollen haploid plants from anther culture and ploidy identification in fruit trees was discussed.

Keywords

Plant Haploid Breeding, Grape, Anther Culture, Haploid, Diploid

葡萄花药培养诱导不出花粉单倍体植株

曹孜义^{1,2}

¹甘肃农业大学生命科学技术学院, 兰州

²甘肃省老教授协会农业委员会, 兰州

Email: caozy@gsau.edu.cn

收稿日期: 2014年5月26日; 修回日期: 2014年6月24日; 录用日期: 2014年7月1日

摘要

本文根据有关文献和自己经历，作者对葡萄单倍体植株诱导培养问题和学术界观点进行了梳理和讨论。对从葡萄花药培养诱导出植株的唯一的一篇文章，从六个方面进行了质疑；依据细胞学、植物形态学、遗传学等方面理论，认为声称得到葡萄单倍体植株仍是二倍体植株。本文指出，根据目前的技术，葡萄花药培养诱导不出花粉单倍体植株；同时，也对果树花药培养诱导单倍体植株和倍性鉴定问题进行了讨论。

关键词

植物单倍体育种，葡萄，花药培养，单倍体，二倍体

1. 引言

植物花药培养诱导出植物单倍体具有重要意义[1]-[4]。自 1966 年 Guhat 和 Maheshwari 报道以来，至今已有 240 多种植物花药培养诱导成功，其中我国首先报道占了 1/4[1]。通过这种方法，我国已培育成功 100 多个品种，并在生产上应用，绝大多数是农作物和蔬菜[2]-[4]。

在果树上，已从苹果、柑橘、梨、桃、樱桃、杏、猕猴桃、油橄榄、桑、番木瓜、荔枝、枇杷等获得了花粉单倍体植株[2]-[5]；关于从葡萄花粉诱导的单倍体植株，仅有邹昌杰和李佩芬一篇报道[6]。但是，该篇的研究结果，没有能够得到其它试验结果证实。现就有关文献和我本人的亲身经历，对葡萄花药培养诱导单倍体植株的过程进行一个回忆，对有关专家的观点进行综述，并就有关技术问题进行讨论，以便大家对于该领域的工作有一个系统的了解，并希望这些资料有助于推进该领域研究工作的开展。

2. 葡萄花药诱导花粉单倍体植株试验及其争论

(1) 用我们的诱导二倍体葡萄花药植株的培养基，诱导成所谓的单倍体植株(见私人通讯)[7]。邹昌杰和李佩芬于 1974 年开展葡萄花药培养的研究，1977 年报道显示只能诱导产生花药愈伤组织[8]，经五年研究一直不能分化成苗。我们 1978 年开始葡萄花药培养研究时，仔细学习了邹昌杰和李佩芬葡萄花药培养诱导愈伤组织的研究论文，发现他们在诱导培养基中没有加 2.4-D。根据我们在小麦、玉米花药培养诱导花粉愈伤组织经验，进行该项工作一定要加脱分化植物激素 2.4-D(浓度是 2 mg/L)。考虑双子叶植物的葡萄对 2.4-D 敏感，我们改为 0.5 mg/L，2.4-D，其它都用邹昌杰和李佩芬的培养基；当年接种了 9 个葡萄品种，结果从一个葡萄品种中诱导出胚状体，继而成苗。随后，我们用了二个月时间，检查了根尖染色体，发现有个别细胞是 19 条，但多数是 38 条的葡萄二倍体，说明这些植株来于花药体细胞[9]。1979 年 5 月我到广西南宁参加全国玉米花药培养学术会议时，讲了我们从葡萄栽培品种中诱导成苗。当时我国花药培养积极倡导者和先驱工作者中国科学院遗传研究所胡含所长听说后，在广西做学术报告大会上介绍了我的工作。当时山东农科院玉米研究所徐庆玉同志听到后，在会中找了我，讲述了山东酿酒葡萄研究所邹昌杰和李佩芬同志搞葡萄花药培养五年，花去七万多元，一直没有得到分化苗。山东省有关部门，也找过好多专家去解决问题，均未成功，希望能得到我们的技术。不久，邹昌杰和李佩芬同志向我们写信求援。他们在信中写到：“我们从事该项工作多年，一直过不了分化关，正当我们山穷水尽疑无路的时候，传来了你们的好消息，使我们感到柳暗花明又一村。请你在百忙中抽空写信给我们详细介绍一下你们的分化关键好吗？你们的好经验，对我们当前的分化工作如同及时雨，如蒙赐教，不胜感激”(见 1979 年 6 月 5 日私人通讯)。我就给邹、李二人写了信，告诉了葡萄诱导分化的技术关键是在葡萄二倍体

花药植株诱导中一定要加低浓度的脱分化植物激素 2.4-D。三个多月后，邹、李二人又来信讲：按照你提供的培养基，我们接种了少量夏梢花花药，现分化成植株，我们重复了你们的试验，并取得了初步成功，我们很感激，也很高兴。又问如何移栽？（见 1979 年 9 月 26 日私人通讯）。我们“葡萄花药诱导植株初获成功”的论文，发表在 1980 年甘肃农业科技第四期上[9]。他们原诱导不出植株，用我们的诱导二倍体葡萄花药植株的培养基，应当诱导还是二倍体葡萄花药植株，而不会是单倍体植株。

(2) 没有 19 条染色体的葡萄花粉单倍体植株的照片。邹昌杰，李佩芬二同志 1981 年发表在植物学报的“葡萄花粉植株的诱导”的论文，图片标明葡萄花粉植株根尖染色体 19 条，是一个不清楚的葡萄二倍体细胞。文中[6]和其合作论文[10]中，介绍有几十、几百和 5 万株葡萄花粉植株，检查了几百上千个根尖细胞染色体，没有一个清晰可数为 19 条的染色体的图片。现在已过了几十年，也没有补上 19 条染色体的照片，可见他们诱导出的葡萄花药植株不是葡萄单倍体花粉植株，而是二倍体葡萄花药植株。

(3) 试验结果没有得到重复试验证实。我们多年、多点从陕西西北农林科技大学、山西太谷山西果树研究所和我校原黄羊镇采集原邹昌杰，李佩芬二同志诱导出的花粉植株的葡萄品种“胜利”花药进行培养，重复 2~3 次，诱导频率的一定差异，但诱导出的植株全为染色体 38 条的二倍体，论文发表在植物学报 1994 年(增刊上)。从三个生态地区“胜利”葡萄花药植株的倍性，也未证实葡萄花药培养能得到葡萄花粉单倍体植株[11]。

(4) 国内外多名学者持怀疑态度和否定态度

(a) 美国明尼苏达大学教授，国际著名植物组织培养学家 Mullins 教授 1990 年的一篇综述中指出：

There is a single report from China of haploid plantlet production in grapevines (Zou and Li 1981), but attempts elsewhere to obtain haploid by culture of anther and pollen of *Vitis vinifera* have been unsuccessful,... Haploid and homozygous diploids derived from them, would be particularly useful for grapevine breeding and for genetic studies. However, it is now 18 years since the first experiment on cultivation in vitro of grapevine anther (Mullins 1971) and haploid are still unavailable [12].

(b) 加拿大园艺学 Monette 教授 1988 年综述中提出：

Zou and Li (1981) reported the first successful induction of haploid plants from anther culture of *V. vinifera*, but this report has yet to be confirmed [13].

国外二位专家的都不信服葡萄花粉植株的诱导论文。

(c) 国内多个学者持否定态度。中科院资深院士、著名细胞生物学家郑国昌教授 1994 年 12 月 15 日的评议书中指出：“此图片不清晰，很难准确计数”。中科院院士，著名细胞染色体专家，东北师大校长郝水教授在信中指出：“邹昌杰，李佩芬在植物学报上发表的简报上的照片来看 $n = 19$ 的根尖染色细胞是不清楚的”。兰州大学生物系教授，甘肃省遗传学会理事长、遗传学家、博士生导师王亚馥教授写到：“文中根尖细胞染色体 $n = 19$ 条照片质量太差，根本看不清，既然文中提到检查了最早分化的 30 棵植株根尖细胞都能见到 $n = 19$ 条的分裂相，却拿不出来一张照片...”。中科院遗传研究所遗传学家谷明光研究员写到：“关于植物学报 1981 卷一期上发表的邹昌杰，李佩芬的论文葡萄花粉植株的诱导中的染色体图片是不清楚的，很难计数染色体数目，如果按这样的图片来确定其染色体为 $n = 19$ 是非常不准确的”。

(5) 在以后的试验中，他们也没有能够证实原来的结果。李佩芬等 1991 年 10 月在长沙植物组织培养学术会议上报告以及其后发表的论文，提到用同一品种、同一培养基、同一地方、同样完成人进行试验，可诱导出的是二倍体，加倍成四倍体，也没有能够培养出单倍体植株[14]。

(6) 遗传学证明葡萄花药培养不出单倍体植株。我们诱导葡萄花药二倍体植株，除细胞染色体计数是 38 条的二倍体植株[11]，不加倍也能结果，套袋自交后代表现出后代分离特性，不纯合[15]，充分证明葡萄花药培养植株是来自体细胞，是二倍体。邹昌杰，李佩芬二同志在论文和其合作论文中，有大量

葡萄花粉植株，不知何因，未见结果情况和后代纯合不分离的报道。这也说明，邹昌杰和李佩芬的葡萄花粉植株不是纯合的加倍单倍体。

3. 讨论

(1) 关于果树花药培养诱导单倍体植株问题

果树是杂合体，花药培养诱导单倍体植株有重要意义，但难度大，育成的品种很少。苹果花药培养成单倍体植株有多人、多篇报道，1981年费开韦[16]从元帅苹果花培单倍体植株的诱导，同年吴绛云[17]也从苹果花药培养获得单倍体植株。薛光荣等自1979年开始研究，1981年从苹果诱导花粉植株后[18]，1984年又从其他苹果品种中诱导出花粉植株[19]，1986年他们报道了苹果花粉植株植物学特性，发现苹果花粉植株，植株小、叶小，分枝多等等特点[18]。1990年薛光荣等又报道了从8个主栽品种的中诱导出花粉植株[20]。2005年他们报道了用“富士”苹果花药培养选育出的高品质新品种，介绍了1985年采用花药培养技术，培育出花粉植株，并移栽成活、开花结果。1996~1999年连续4年对其果实经济性状进行调查，其果实大小、果形指数、可溶性固形物、可溶性糖等多项指标均不同程度地超过对照品种(长富2)。1996年开始育苗，1998年建立对比试验点，2004年4月通过辽宁省农作物品种审定委员会审培育成功[21]。2007年，他们用倍性分析仪对3株苹果花药培养植株进行了倍性鉴定，并用AS-PCR分子标记分析其是否为纯合体。流式细胞法测定其倍性分别为二倍体、三倍体和四倍体；AS-PCR分析证明它们为纯合基因型[22]。因此，对于苹果花粉单倍体植株培养，已从不同方法、不同研究者、不同品种得到证实。

对于邹昌杰和李佩芬从葡萄花药诱导的单倍体植株，没有象苹果诱导花粉植株那样，在植物学、形态学、解剖学、细胞学、遗传学等上得到证明；也没得到不同方法、不同研究者、不同品种、不同论文的验证。相反，我们诱导出的葡萄花药二倍体植株，细胞学、遗传学和生态学等等证据都表明是二倍体植株[9] [11] [15]。

(2) 关于倍性确定问题

高等植株的花药再生植株的起源的鉴定方法，有染色体数鉴定、花粉启动鉴定、遗传学鉴定和分子鉴定等。在这些方法中，染色体数鉴定最常用，只要见到该植株多数细胞染色体数只有原来的一半，就可判定。如没有单倍体染色体数鉴定，若说它自然加倍，那就要有花粉启动鉴定、遗传学鉴定或分子鉴定，这些鉴定指标越多说服力越强。1964年，印度科学家 Guhat 和 Maheshiwari 从蔓陀萝花药获得再生植株，再通过二年研究，确证来自蔓陀萝的花粉，1966年才正式公开报道，可见其工作的严谨性。

张圣仓等[4]在综述果树单倍体和加倍单倍体(DH)技术研究与应用进展中提出，果树单倍体的鉴定方法有形态学和解剖学鉴定、染色体计数、流式细胞仪、同工酶分析等方法，这些单倍体鉴定方法最好都用才有说服力。仅仅凭一张数不清染色体的细胞图片，又没有形态学和解剖学、细胞学、花粉启动、遗传学和分子生物学鉴定，来确定葡萄花粉单倍体植株诱导成功，看来缺乏科学的严谨性。

Mullins 自1971年开始研究葡萄的花药培养，已历经30年，其它许多国家的科技工作者也报道了从葡萄花药培养能诱导出植株，但都为二倍体植株[12] [13] [23] [24]。同时，从自然界中也未能找到葡萄天然单倍体植株，表明自然界不存在葡萄单倍体植株，并认为葡萄单倍体受致死基因控制，有单倍体的胚，没有单倍体的苗[12]。

国内外大量资料表明，葡萄的花药培养是培养不出花粉单倍体植株的，原报道的葡萄花粉单倍体的植株，仍是花药二倍体植株。

参考文献 (References)

- [1] 王延玲, 丰震, 赵兰勇 (2006) 植物花药培养研究进展. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 1, 149-151.

- [2] 沈德绪 (1995) 果树育种学(第二版). 农业出版社, 北京, 135-138.
- [3] 张绿萍, 陈红 (2007) 园艺植物花药培养研究进展. *安徽农业科学*, **17**, 5140-5142.
- [4] 张圣仓, 魏安智, 杨途熙 (2011) 果树单倍体和加倍单倍体(DH)技术研究与应用进展. *果树学报*, **5**, 869-874.
- [5] 张洁, 张学英, 葛会波 (2002) 果树花药培养研究概况. *河北农业大学学报*, **25(增刊)**, 95-97.
- [6] 邹昌杰, 李佩芬 (1981) 葡萄花粉植株的诱导. *植物学报*, **4**, 79-81.
- [7] 邹昌杰, 李佩芬的私人通讯.
- [8] 邹昌杰, 等 (1977) 葡萄花药愈伤组织的诱导. 葡萄花药培养学术讨论会文集, 科学出版社, 206-208
- [9] 曹孜义, 郭采月, 齐与振, 等 (1980) 葡萄花药植株诱导成功. *甘肃农业科技*, **4**, 26-29.
- [10] 鲍雪珍, 张建琪, 于洪浩, 邹昌杰, 李佩芬 (1980) 葡萄胚状体发生的初步研究. *山东大学学报(自然科学版)*, **3**, 101-106.
- [11] 曹孜义 (1994) 三个生态地区“胜利”葡萄花药植株的倍性. *植物学报*, **36(增刊)**, 151-154.
- [12] Mullins, M.G. (1990) Application of tissue culture to the genetic improvement of grapevines. *Proceeding of the 5th International Symposium on Grape Breeding Vitis (Special Issue)*, 399-497
- [13] Monette, P.I. (1988) Grapevine (*Vitis vinefera* L.), biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 6, Springer-Verlag, Berlin, 2-37.
- [14] 李佩芬, 卢炳芝, 于向荣, 等 (1995) 葡萄细胞诱变植株的培育. *葡萄栽培与葡萄酒*, **1**, 20-22.
- [15] 杨宁, 陈伯鸿, 曹孜义, 郝燕 (2004) 胜利葡萄花药植株结实特性及其后代分离的观察. *河北林业科技*, **24**, 56-58.
- [16] 费开韦, 薛光荣 (1981) 元帅苹果花药培养诱导单倍体植株. *中国农业科学*, **4**, 41-44.
- [17] 吴绛云 (1981) 苹果花药培养获得单倍体植株. *园艺学报*, **4**, 36-37.
- [18] 薛光荣, 牛健哲 (1983) 苹果花药培养又获进展. *中国果树*, **1**, 46.
- [19] 薛光荣, 牛健哲 (1984) 诱导苹果花粉植株的研究. *园艺学报*, **3**, 162-0164.
- [20] 薛光荣, 等 (1990) 苹果花药培养技术及 8 个主栽品种的花粉植株培育成功. *中国农业科学*, **3**, 86.
- [21] 杨振英, 薛光荣, 苏佳明, 迟福梅, 牛健哲, 丛佩华 (2005) 富士花药培养选育出苹果新品种华富. *园艺学报*, **1**, 172.
- [22] 张利义, 杨振英, 丛佩华, 张开春, 刘建利, 薛光荣 (2007) 苹果花药培养植株倍性及其纯合基因型的鉴定. *园艺学报*, **2**, 481-484.
- [23] 新关宏夫 (1976) 花粉育种. *自然(日文)*, **31**, 38-47.
- [24] Stamp, J.A. and Meredith, C.P. (1988) Somatic embryogenesis from leaves and amters of grapevine. *Sienta Horticultires*, **35**, 235-250.