

小麦花药培养体系优化及高再生力基因型的筛选

李 慧^{1,2}, 赵林姝², 古佳玉², 郭会君², 谢永盾², 熊宏春²,
赵世荣², 丁玉萍², 徐延浩¹, 刘录祥²

(¹ 长江大学农学院 / 主要粮食作物产业化湖北省协同创新中心, 湖北荆州 434025; ² 中国农业科学院作物
科学研究所 / 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程 / 国家农作物航天诱变技术改良中心, 北京 100081)

摘要: 目前花药培养白苗再生较多, 因此选取不同成分的碳源对花药培养体系进行优化, 并利用优化的体系连续 2 年对 22 个小麦品种(系)的培养力进行了鉴定。结果表明, 以国药公司蔗糖为碳源进行离体培养的花药没有产生胚状体; 以 Sigma 公司麦芽糖和 Phytotech 公司麦芽糖为碳源时, 花药均可以脱分化形成胚状体并进一步再生植株, 绿苗产率在此 2 种麦芽糖间无显著差异, 但白苗产率在 2 种麦芽糖间差异显著, Sigma 麦芽糖条件下白苗产率显著高于 Phytotech 麦芽糖, 说明利用 Phytotech 麦芽糖能减少白苗的再生。22 个品种(系)的绿苗及白苗产率差异显著, 筛选出高绿苗再生力基因型河农 6425 (33.97%)、洛麦 28 (22.28%) 和郑麦 136 (15.63%), 高白苗再生力基因型小偃 22 (39.69%)、郑麦 136 (33.99%)、洛麦 28 (42.17%) 和豫农 903 (28.59%), 高植株再生力基因型小偃 22 (46.69%)、郑麦 136 (49.62%)、洛麦 28 (64.45%)、河农 6425 (41.47%) 和豫农 903 (31.69%)。本研究鉴定筛选的高再生力基因型可作为单倍体育种、基因定位或遗传转化研究的基础材料。

关键词: 小麦; 花药培养体系优化; 基因型; 碳源; 植株再生能力

Optimizing of Anther Culture System and Screening Wheat Genotypes with Higher Regeneration Ability

LI Hui^{1,2}, ZHAO Lin-shu², GU Jia-yu², GUO Hui-jun², XIE Yong-dun²,
XIONG Hong-chun², ZHAO Shi-rong², DING Yu-ping², XU Yan-hao¹, LIU Lu-xiang²

(¹ College of Agriculture, Yangtze University/Hubei Collaborative Innovation Center for Grain Industry, Hubei Jingzhou 434025;

² Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/National Center of Space Mutagenesis for Crop Improvement, Beijing 100081)

Abstract: The high rate of albino plants is an issue in wheat anther culture system. In this study, carbon sources with different components were selected to optimize the anther culture system, followed by evaluating the culture ability of 22 wheat varieties (lines) samples harvested at two consecutive years. The anthers cultured *in vitro* with Sinopharm sucrose did not produce embryoids, whereas anthers succeeded in dedifferentiation into embryoids and further regenerate plantlets when using maltose from Sigma and Phytotech. No significant difference in the green plantlets per 100 anthers, but a significant difference in the albino plantlets per 100 anthers between the two kinds of maltose were observed. The albino plantlets per 100 anthers using Sigma maltose was significantly higher than that using Phytotech maltose. Moreover, the green/albino plantlets per 100 anthers was significantly different among 22 varieties (lines). The genotypes showing high green plantlet regeneration ability

收稿日期: 2021-10-21 修回日期: 2021-12-22 网络出版日期: 2022-02-09

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20211021003>

第一作者研究方向为植物分子育种, E-mail: 1124551918@qq.com

通信作者: 徐延浩, 研究方向为植物分子育种, E-mail: xyh@hbaas.com

刘录祥, 研究方向为小麦诱变育种, E-mail: liuluxiang@caas.cn

基金项目: 国防科工局核能开发科研项目“核辐射作物品种改良与害虫防控”

Foundation project: Nuclear Energy Development Research Program of the State Administration of Science, Technology and Industry for National Defense “Crop Varietal Improvement and Insect Pests Control by Nuclear Radiation”

were henong 6425 (33.97%), Luomai 28 (22.28%) and Zhengmai 136 (15.63%), and the genotypes showing high albino plantlet regeneration ability were Xiaoyan 22 (39.69%), Zhengmai 136 (33.99%), Luomai 28 (42.17%) and Yunong 903 (28.59%), and the genotypes showing high plantlet regeneration ability were Xiaoyan 22 (46.69%), Zhengmai 136 (49.62%), Luomai 28 (64.45%), Henong 6425 (41.47%) and Yunong 903 (31.69%). Through identifying the genotypes with high regeneration ability, this study provided the genotypes suitable for haploid breeding, gene mapping and genetic transformation in common wheat.

Key words: wheat; optimization of anther culture system; genotype; carbon source; plant regeneration ability

单倍体是指含有配子染色体数的个体,经自然或人工加倍后可以获得纯合的双单倍体^[1],在育种^[2-3]、基因定位^[4-5]、遗传转化^[6-7]等研究中具有重要作用。小麦单倍体培养方法主要有花药培养^[8-9]、小孢子离体培养^[10-11]和小麦×玉米远缘杂交法等^[12-13]。1964年,Guha等^[14]首次通过曼陀罗花药离体培养获得单倍体植株后,国内外学者开展了大量的研究,相继在烟草^[15]、水稻^[16]、大麦^[17]、柑橘^[18]等植物中通过花药培养技术获得了单倍体植株。目前,国内外育种家利用花药培养技术已选育出京花1号^[19]、AC Andrew^[20]、陕农28^[21]、生选6号^[22]、陇春31号^[23]等多个小麦品种并在生产上应用。

基因型、小孢子发育时期、培养基、培养条件等是影响花药培养力的主要因素,培养过程中大量白苗的再生又使绿苗获得率大大降低。Lantos等^[24]对4个冬小麦基因型进行花药培养,发现胚状结构(ELS, Embryo-like structures)、绿苗产率和白苗产率基因型间差异显著。兰素缺等^[25]研究了蔗糖、麦芽糖及其水解产物对不同基因型愈伤诱导的影响,初步结果表明,单独使用麦芽糖作碳源培养效果最佳。

高再生力基因型可以为单倍体育种、基因定位及遗传转化研究提供基础材料。赵林姝等^[26]从74个冬小麦品种(系)中筛选出高绿苗再生力和农艺性状较好的基因型SPLM2、衡96851、石4185、邯6172和河农6425,并用于单倍体育种工作。吕学莲等^[27]从140份不同基因型的小麦亲本及其杂种F₁和F₃中筛选到宁春4号、Jinghong No 2、鉴63、Chuanmai18、Synthderiv.29589、S111、D-27、晋偃746-9和K6-39等基因型,这些高培养力基因型可作为花培育种的骨干亲本,提高育种效率。Guan等^[28]、Xu等^[29-30]分别利用高培养力基因型农大3338、中麦895、矮抗58分别与京冬6号、扬麦16、荆州66杂交构建了含有203、198和209个

DH系的群体,并分别利用构建的DH群体对小麦产量、白粉病、赤霉病性状进行了QTL定位。高洁等^[31]选用具有良好花药培养能力的高代小麦品系K35,成功建立了以花药为受体的小麦转基因技术体系,并获得了经PCR检测为阳性的植株。Han等^[32]研究建立一个基于花药培养的遗传转化和基因编辑平台,从而高效创建转基因和基因编辑植株。

本研究对花药培养的碳源进行了优化,同时利用优化的花药培养体系对北部及黄淮冬麦区推广的22个小麦品种(系)的花药培养再生能力进行了鉴定,以筛选高再生力基因型。本研究将为单倍体育种、基因定位或遗传转化研究提供材料支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料包括小偃22、衡136、济麦22、鲁原502、新麦26、周麦18、周麦36、郑麦136、兰考198早熟、洛麦28、河农6425、烟农19、存麦5号、西农20、济麦44、济麦52、石优20、宁麦9号、豫农903、豫农905、郑麦7698、石99-6123、百农矮抗58和石4185,共24份小麦主栽品种(系),分别于2020年9月和2020年12月盆栽于中国农业科学院作物科学研究所北圃场温室,于2020年10月和2021年1月取样接种,温度白天23~28℃、夜晚12~18℃,光照时间18/6h(昼/夜),光照强度200 μmol/m²·s,小麦生长期适时进行浇水施肥,防治蚜虫和白粉病。

1.2 接种方法和培养条件

选取花粉粒发育至单核中晚期的麦穗(一般在打苞期,穗子尚未露出旗叶叶鞘时),用锡箔纸包裹后放入装有清水的烧杯中,置于4℃冰箱低温预处理1d。接种前将穗子剥出,用2%次氯酸钠灭菌

30 min,超净工作台中无菌蒸馏水冲洗 3~4 次,用镊子取出花药置于诱导培养基上,参照 Broughton^[33]的方法,花药脱分化培养置于生化培养箱内,28±1℃ 暗培养 35 d。胚状体分化培养置于组培室,24~26℃ 光培养 3 周,光强 2000 lx,分化培养基参照赵林姝等^[26]的方法,采用 MS 培养基+1.0 mg/L NAA+1.0 mg/L KT+30 g/L 蔗糖+5 g/L 琼脂,PH 5.8。

1.3 液体培养基中散落小孢子观察方法

利用 OLYMPUS SZX16 体视显微镜观察脱分化培养 4 d 于液体培养基^[33]中散落的小孢子,物镜 1.6×,目镜 10×,并拍照。

1.4 不同碳源处理对植株再生的影响

选取分化率较高基因型百农矮抗 58 和石 4185 的适期麦穗,花药接种到分别含有 Sigma 麦芽糖、Phytotech 麦芽糖和国药蔗糖 3 种碳源(浓度均为 90 g/L)的培养基^[33]中,研究不同碳源处理对植株再生的影响。每个处理 21 个穗子,每穗选取中上部小穗花药接种,每 3 个穗子接种于 1 个培养皿中,3 次重复,培养条件同 1.2。

1.5 高再生力基因型的筛选

选取小偃 22、衡 136、济麦 22、鲁原 502、新麦 26、周麦 18、周麦 36、郑麦 136、兰考 198 早熟、洛麦 28、河农 6425、烟农 19、存麦 5 号、西农 20、济麦 44、济麦 52、石优 20、宁麦 9 号、豫农 903、豫农 905、郑麦 7698 及石 99-6123 共 22 个品种(系)的适期麦穗,利用优化的花药培养体系(液体培养基^[33]+90 g/L Phytotech 麦芽糖),研究不同品种的植株再生能力差异。每个基因型接种 18 个穗子,每穗选取中上部小穗花药接种,每 3 个穗子接种于 1 个培养皿中,3 次重复,培养条件同 1.2。

1.6 数据统计与分析

分化培养基中培养 20 d 左右愈伤组织再生出

苗并生根,统计绿苗植株、白苗植株和再生植株的数量。

绿苗产率=(产生的绿苗数/接种花药数)×100%;

白苗产率=(产生的白苗数/接种花药数)×100%;

植株再生率=(再生植株数/接种花药数)×100%;

使用 Microsoft Excel 2019 对试验数据进行整理和统计分析,利用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析。

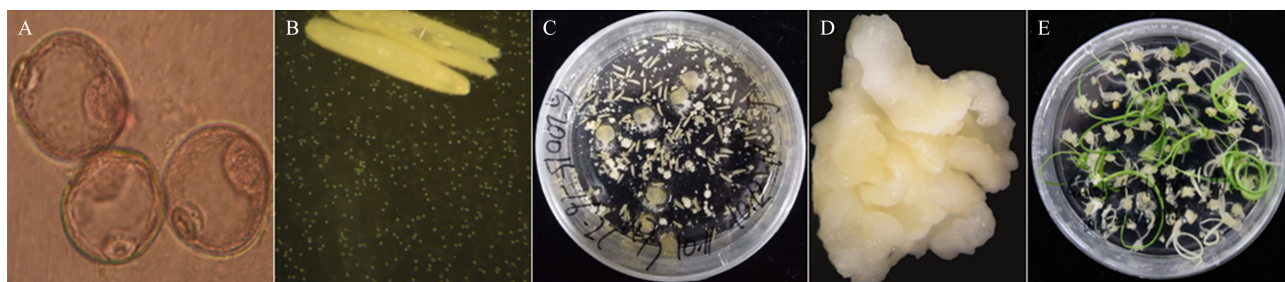
2 结果与分析

2.1 小麦花药的脱分化及再分化

选取单核中晚期花药(图 1A)进行离体培养,经过 5 d 甘露醇培养基预处理后,花药转至液体培养基中继续脱分化培养,体视显微镜观察可见小孢子散落到液体培养基中(图 1B)。离体培养 20 d 后培养基中形成肉眼可见的白色颗粒状物质,35 d 后形成胚状体(图 1C、D);将胚状体转入分化培养基中进行分化培养,14 d 左右可再生出植株(图 1E)。

2.2 不同碳源对植株再生能力的影响

由表 1 可以看出,小麦基因型百农矮抗 58 和石 4185 在不同碳源条件下的培养力有显著差异,以国药公司蔗糖为碳源进行离体培养时,2 个基因型均没有产生胚状体。以 Sigma 公司麦芽糖和 Phytotech 公司麦芽糖为碳源时,2 个基因型的绿苗产率在 2 种碳源间无显著差异;但白苗产率在 2 种碳源间差异显著,2 个基因型在 Sigma 麦芽糖条件下的白苗产率均显著高于 Phytotech 麦芽糖。初步结果表明,以 Phytotech 麦芽糖为碳源的培养基具有降低白苗再生的作用。根据以上试验结果,以 Phytotech 麦芽糖替代 Sigma 麦芽糖和国药蔗糖,可以降低白苗再生。



A: 单核靠边期小孢子; B: 释放到液体培养基中的小孢子; C、D: 培养 35 d 产生的胚状体; E: 再生植株

A: Microspores at the late uninucleate stage, B: Microspores released from the liquid medium,

C, D: Embryos after 35 days of anther culture, E: Regenerated plantlets

图 1 花药离体培养的脱分化及再分化

Fig.1 Dedifferentiation and redifferentiation of anther culture in vitro

表 1 不同碳源对百农矮抗 58 和石 4185 植株再生能力的影响

Table 1 Effects of different carbon sources on plant regeneration of Bainongaikang 58 and Shi 4185

基因型 Genotype	处理 Treatment	花药数 Anther number	绿苗数 Green seedling number	白苗数 Albino number	绿苗产率(%) Green plantlets per 100 anthers	白苗产率(%) Albino plantlets per 100 anthers
百农矮抗 58	Sigma 麦芽糖	1314	179	684	13.62a	52.05a
Bainongaikang 58	Phytotech 麦芽糖	1418	168	256	11.85a	18.05b
	国药蔗糖	1287	0	0	0b	0c
石 4185	Sigma 麦芽糖	1397	420	969	30.06a	69.36a
Shi 4185	Phytotech 麦芽糖	1473	373	410	25.32a	27.83b
	国药蔗糖	1380	0	0	0b	0c

不同字母表示处理间存在显著性差异(采用 LSD 法, $P<0.05$)

Means followed by different letters are significantly different among treatments according to LSD test ($P<0.05$)

2.3 不同基因型的绿苗再生力差异

连续两年的重复试验中, 22 个基因型的绿苗产率分布范围分别为 0~40.21% 和 0~33.29%, 平均数为 3.90% 和 8.52%, 中位数为 1.01% 和 5.41%, 基因型间绿苗产率差异显著。2020 年试验中多数基因型绿苗产率偏低, 绿苗产率小于 5% 的基因型有 18 个, 占所研究基因型的 81.82%, 绿苗产率高

于 7% 的基因型有 3 个, 其中河农 6425 的绿苗产率最高(表 2)。2021 年试验中绿苗产率小于 5% 的基因型有 9 个, 占所研究基因型的 40.91%, 有 4 个基因型的绿苗产率超过 20%, 以洛麦 28 的绿苗产率最高(表 2)。连续两年的重复试验中河农 6425 (33.97%)、洛麦 28 (22.28%) 和郑麦 136 (15.63%) 均获得了较高的绿苗率。

表 2 22 个小麦基因型的花药培养力

Table 2 Anther culture ability of twenty-two wheat genotypes

基因型 Genotype	年份 Year	接种花药数 Number of inoculated anthers	绿苗产率(%) Green plantlets per 100 anthers		白苗产率(%) Albino plantlets per 100 anthers		植株再生率(%) Plantlets regeneration per 100 anthers	
			年度值 Annual value	平均值 Mean value	年度值 Annual value	平均值 Mean value	年度值 Annual value	平均值 Mean value
小偃 22	2020	294	1.36 Bb	6.80	26.78 ABCbc	39.69	28.14 ABCDbcde	46.69
Xiaoyan 22	2021	818	12.24* BCDc		52.59 Aa		64.84 Aab	
衡 136	2020	639	0.77 Bb	0.51	2.44 Def	4.80	3.21 Df	5.31
Heng 136	2021	834	0.25 Dd		7.16 CDEfg		7.40 DEFgh	
济麦 22	2020	321	0.95 Bb	1.88	4.91 DEef	5.93	5.86 Def	7.81
Jimai 22	2021	423	2.80 Dcd		6.95 CDEfg		9.75 DEFfgh	
鲁原 502	2020	801	3.35 Bb	6.81	19.38 BCDEbcde	22.34	22.73 BCDcdef	29.14
Luyuan 502	2021	1341	10.26 BCDcd		25.29 BCDbcd		35.55 BCDcd	
新麦 26	2020	834	3.02 Bb	4.22	20.70 BCDbcd	24.23	23.72 BCDcdef	28.45
Xinmai 26	2021	525	5.42 Dcd		27.75 BCbc		33.17 CDcde	
周麦 18	2020	609	0.58 Bb	1.59	4.48 DEef	7.54	5.06 Def	9.13
Zhoumai 18	2021	1002	2.60 Dcd		10.60 CDEdefg		13.20* DEFefgh	
周麦 36	2020	534	0 Bb	0	0 Ef	0	0 Df	0
Zhoumai 36	2021	621	0 Dd		0 Eg		0 Fh	
郑麦 136	2020	1281	7.80 Bb	15.63	30.04 ABb	33.99	37.84 ABCabc	49.62
Zhengmai 136	2021	846	23.46* ABab		37.93 ABb		61.39 ABab	
兰考 198 早熟	2020	468	1.31 Bb	3.35	17.95 BCDEbcde	21.53	19.26 BCDcdef	24.88
Lankao 198 zaoshu	2021	1089	5.39* Dcd		25.11 BCDbcd		30.50 CDEcdef	
洛麦 28	2020	351	11.27 Bb	22.28	44.54 Aa	42.17	55.81 Aa	64.45
Luomai 28	2021	516	33.29* Aa		39.79 ABab		73.08 Aa	

表 2(续)

基因型 Genotype	年份 Year	接种花药数 Number of inoculated anthers	绿苗产率(%) Green plantlets per		白苗产率(%) Albino plantlets per		植株再生率(%) Plantlets regeneration per	
			100 anthers		100 anthers		100 anthers	
			年度值 Annual value	平均值 Mean value	年度值 Annual value	平均值 Mean value	年度值 Annual value	平均值 Mean value
河农 6425	2020	804	40.21 Aa	33.97	6.48 DEdef	7.51	46.69 ABab	41.47
Henong 6425	2021	690	27.72 Aab		8.53 CDEefg		36.25 BCDcd	
烟农 19	2020	357	0 Bb	4.33	0.30 Ef	5.46	0.30 Df	9.79
Yannong 19	2021	459	8.66* CDcd		10.62** CDEdefg		19.28* CDEFdefgh	
存麦 5 号	2020	411	0 Bb	1.34	0.57 Def	4.12	0.57 Df	5.46
Cunmai 5 hao	2021	591	2.68 Dcd		7.67 CDEfg		10.34 DEFfgh	
西农 20	2020	330	2.86 Bb	12.59	2.88 Def	13.70	5.73 Def	26.28
Xinong 20	2021	576	22.31* ABCb		24.51* BCDbcde		46.82* ABCbc	
济麦 44	2020	664	2.60 Bb	4.09	14.27 BCDEcdef	12.39	16.86 BCDcdef	16.47
Jimai 44	2021	948	5.58 Dcd		10.50 CDEdefg		16.08 DEFdefgh	
济麦 52	2020	324	0 Bb	2.63	0.62 DEF	3.07	0.62 Df	5.70
Jimai 52	2021	1104	5.26** Dcd		5.51* DEfg		10.77** DEFfgh	
石优 20	2020	1089	0 Bb	3.77	0.09 Ef	9.70	0.09 Df	13.46
Shiyou 20	2021	1334	7.53* Dcd		19.30** BCDEcdef		26.83** CDEFcdefg	
宁麦 9 号	2020	786	0.50 Bb	0.32	8.15 CDEdef	5.78	8.65 CDdef	6.10
Ningmai 9 hao	2021	711	0.14 Dd		3.41 DEfg		3.55 EFh	
豫农 903	2020	537	0.49 Bb	3.10	32.05 ABab	28.59	32.54 ABCDbcd	31.69
Yunong 903	2021	840	5.70 Dcd		25.13 BCDbcd		30.83 CDEcdef	
豫农 905	2020	543	0 Bb	0	0.17 Ef	1.28	0.17 Df	1.28
Yunong 905	2021	579	0 Dd		2.39 Eg		2.39 EFh	
郑麦 7698	2020	564	1.07 Bb	1.30	20.22 BCDEbcd	14.58	21.29 BCDcdef	15.88
Zhengmai 7698	2021	660	1.53 Dcd		8.94 CDEdefg		10.47 DEFfgh	
石 99-6123	2020	886	6.30 Bb	5.42	9.78 CDEdef	10.16	16.07 BCDcdef	15.57
Shi 99-6123	2021	924	4.53 Dcd		10.54 CDEdefg		15.06 DEFdefgh	

* 和 ** 分别表示同一基因型不同年份间存在显著 ($P<0.05$)、极显著 ($P<0.01$) 差异,大、小写字母分别表示同一年份基因型间存在极显著 ($P<0.01$)、显著 ($P<0.05$) 差异 (采用 LSD 法)

* and ** indicated significant ($P<0.05$) and extremely significant ($P<0.01$) differences between the same genotypes in different years, respectively. Capital and small letters denote extremely significant ($P<0.01$) and significant ($P<0.05$) different respectively among genotypes in the same year according to LSD test

2.4 不同基因型的白化苗率差异

与绿苗产率类似,各基因型间白苗产率也表现出显著差异。连续两年的重复试验中 22 个基因型的白苗产率分布范围分别为 0~44.54% 和 0~52.59%,平均数为 12.19% 和 16.83%,中位数为 7.32% 和 10.57%,白苗产率高于平均数的基因型均有 9 个。2020 年试验中白苗产率大于 10% 的基因型有 9 个,占所研究基因型的 40.91%。其中,白苗产率最高的基因型为洛麦 28,其次为豫农 903、郑麦 136 和小偃 22,而周麦 36、石优 20、豫农 905 等基因型白苗产率较低(表 2)。2021 年试验中白苗产

率大于 10% 的基因型有 13 个,占所研究基因型的 59.09%。其中,白苗产率最高的基因型为小偃 22,其次为洛麦 28 和郑麦 136,而周麦 36、豫农 905、宁麦 9 号等基因型白苗产率较低(表 2)。连续两年的重复试验中除了周麦 36,其他基因型均有白苗再生。小偃 22(39.69%)、郑麦 136(33.99%)、洛麦 28(42.17%)和豫农 903(28.59%)在连续两年的重复试验中白苗再生率均较高。

2.5 不同基因型的植株再生能力差异

各基因型的植株再生率差异显著。连续两年的重复试验中 22 个基因型的植株再生率分布范围分别为

0~55.81% 和 0~73.08%, 平均数为 16.09% 和 25.34%, 中位数为 12.36% 和 17.68%。连续两年的重复试验中洛麦 28 基因型的植株再生率均最高, 周麦 36 基因型均未再生植株。小偃 22 (46.69%)、郑麦 136 (49.62%)、洛麦 28 (64.45%)、河农 6425 (41.47%) 和豫农 903 (31.69%) 均获得了较高的植株再生率。其中, 2020 年试验中植株再生率小于 10% 的基因型有 11 个, 占所研究基因型的 50.00%, 高于 40% 的基因型有 2 个 (洛麦 28、河农 6425), 其次是小偃 22、豫农 903 和郑麦 136 基因型的植株再生率均高于 28% (表 2)。2021 年试验中植株再生率小于 10% 的基因型有 5 个, 占所研究基因型的 22.73%, 高于 60% 的基因型有 3 个 (郑麦 136、小偃 22、洛麦 28), 其次是河农 6425 和西农 20 基因型的植株再生率均高于 36% (表 2)。

3 讨论

3.1 碳源对小麦花药离体培养再生能力的影响

研究表明, 麦芽糖与蔗糖相比, 麦芽糖在小麦花药培养中效果更佳, 以麦芽糖作碳源的培养基愈伤组织诱导率高于麦芽糖和蔗糖搭配使用的培养基以及蔗糖培养基^[25]。本研究选用 3 种碳源 (Sigma 麦芽糖、Phytotech 麦芽糖、国药蔗糖) 处理的培养基, 对两个小麦基因型百农矮抗 58 和石 4185 的花药进行离体培养, 结果表明, 两个基因型的绿苗产率在 Sigma 麦芽糖和 Phytotech 麦芽糖间没有显著差异, 但含有 Phytotech 麦芽糖的培养基显著降低了白

苗产率。本研究以国药公司蔗糖为碳源进行离体培养的花药没有分化出胚状体, 与前人研究结果一致^[34]。本研究初步结果表明, Phytotech 麦芽糖减少了白苗再生, 由于本试验只选择两个小麦基因型, 数量较少, 后续还有待利用更多的基因型进行验证。

3.2 植株再生能力的基因型依赖性

基因型依赖性限制小麦花药培养技术广泛应用的重要因素之一。本研究利用优化的小麦花药培养体系连续两年对 22 个小麦基因型的植株再生能力进行了鉴定, 结果表明不同基因型间绿苗产率、白苗产率和植株再生率均差异显著, 与前人研究结果一致^[24, 26]。通过对本试验所研究基因型两年间数据的比较分析, 发现多数基因型年度间结果基本一致, 但烟农 19、西农 20、济麦 52、石优 20 等 9 个基因型年度间差异显著 (表 2), 分析有可能是因为并未对每批接种材料均进行镜检, 取样时期差异导致。

通过与前人研究结果的比较分析^[26, 35-37], 发现除小偃 22 基因型 2020 年的绿苗分化率结果 (1.36%) 低于文献中报道的结果 (1.68%) 外, 小偃 22 (2021 年)、郑麦 7698、济麦 22、鲁原 502、河农 6425 基因型的绿苗分化率均高于文献中报道的绿苗分化率, 说明本研究采用的花药培养体系具有较好的效果; 但同时也发现, 除周麦 18 外, 本研究中的济麦 22、鲁原 502 和河农 6425 的白苗分化率也高于文献中报道的, 说明本试验采用的花药培养体系在提高绿苗产率的同时也增加了白苗的分化 (表 3)。

表 3 本试验不同基因型与参考文献的分化结果比较

Table 3 Comparison of results of genotypic differentiation between the present study and reference

基因型 Genotype	绿苗产率(%) Green plantlets per 100 anthers		白苗产率(%) Albino plantlets per 100 anthers		参考文献所用培养基 Reference medium
	本试验	参考文献	本试验	参考文献	
	The experiment	References	The experiment	References	
郑麦 7698	1.07	0.81 ^[35]	20.22	—	诱导培养和分化培养分别采用 CHB-1 和 CHB-0 培养基 ^[35]
Zhengmai 7698	1.53		8.94		
小偃 22	1.36	1.68 ^[36]	26.78	—	
Xiaoyan 22	12.24		52.59		诱导培养和分化培养分别采用 C17 和 MS 培养基 ^[36]
济麦 22	0.95	0 ^[26]	4.91	0 ^[26]	诱导培养和分化培养分别采用 C17 和 MS 培养基 ^[26]
Jimai 22	2.80		6.95		
鲁原 502	3.35	0 ^[26]	19.38	0 ^[26]	
Luyuan 502	10.26		25.29		
河农 6425	40.21	0.72 ^[26]	6.48	1.71 ^[26]	
Henong 6425	27.72		8.53		
周麦 18	0.58	0.33 ^[26]	4.48	2.11 ^[26]	诱导培养和分化培养分别采用 W14 和 1/2MS 培养基 ^[37]
Zhoumai 18	2.60	—	10.60	31.24 ^[37]	

— 表示无数据。基因型对应的数据第一行是 2020 年的, 第二行是 2021 年的

The representative of — is nothing. In this study, the first row of genotypes is the data from 2020, and the second row is the data from 2021

高花药培养力基因型在小麦花培育种中极为重要^[38],其中石 4185、宇春 5 号等基因型是目前公认的花培育种的优良亲本,本研究筛选出的洛麦 28 和郑麦 136 的绿苗再生率和白苗再生率均较高,河农 6425 基因型的绿苗再生率较高,小偃 22 和豫农 903 基因型的植株再生率较高。赵林姝^[26]等研究表明河农 6425 基因型可作为花培育种的骨干亲本,与前人研究结果一致。有研究表明,通过花药培养筛选出可作为桥梁亲本的材料宁春 4 号^[27,38]。由于所研究基因型和试验方法的不同,筛选的高再生率基因型会有所差异。本研究筛选出的高再生率品种可以为单倍体育种、基因定位及遗传转化研究提供基础材料。

参考文献

- [1] 周霞,邓英,陈劲枫. 瓜类作物离体雌核诱导单倍体研究进展. 园艺学报, 2020, 47(9): 1810-1826
Zhou X, Deng Y, Chen J F. Research progress on haploid induction of cucurbitaceous crops based on in vitro gynogenesis. Acta Horticulturae Sinica, 2020, 47(9): 1810-1826
- [2] Lantos C, Pauk J. Anther culture as an effective tool in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding. Genetika, 2016, 52(8): 910-918
- [3] Lantos C, Purgel S, Ács K, Langó B, Bóna L, Boda K, Békés F, Pauk J. Utilization of in vitro anther culture in spelt wheat breeding. Plants (Basel), 2019, 8(10): 436-448
- [4] Beghey R F, Yates S A, Sykes T, Studer B. Genetic loci governing androgenic capacity in *Perennial Ryegrass* (*Lolium perenne* L.). G3 Genes Genomes Genetics, 2018, 8(6): 1897-1908
- [5] Jiao Y Y, Li J L, Li W, Chen M, Li M R, Liu W X, Liu C X, Chen S J. QTL mapping and prediction of haploid male fertility traits in maize (*Zea mays* L.). Plants, 2020, 9(7): 836-847
- [6] Rustgi S, Ankrah N O, Brew-Appiah R A T, Sun Y, Liu W G, Von Wettstein D. Doubled haploid transgenic wheat lines by microspore transformation. Methods in Molecular Biology, 2017, 1679: 213-234
- [7] Ohnoutková L, Vlčko T. Homozygous transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plants by anther culture. Plants (Basel), 2020, 9(7): 918-928
- [8] Abd El Fatah Bahaa E S, Sayed Mohammed A, El Sanusy Sahar A. Genetic analysis of anther culture response and identification of QTLs associated with response traits in wheat (*Triticum aestivum* L.). Molecular Biology Reports, 2020, 47(12): 9289-9300
- [9] Castillo A M, Valero-Rubira I, Allué S, Costar M A, Vallés M P. Bread wheat doubled haploid production by anther culture. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2021, 2287: 227-244
- [10] Canonge J, Philippot M, Leblanc C, Potin P, Bodin M. Impedance flow cytometry allows the early prediction of embryo yields in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore cultures. Plant Science, 2020, 300: 110586-110594
- [11] Cistué L, Romagosa I, Batlle F, Echávarri B. Improvements in the production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. Plant Cell Reports, 2009, 28(5): 727-735
- [12] Santra M, Wang H, Seifert S, Haley S. Doubled haploid laboratory protocol for wheat using wheat-maize wide hybridization. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2017, 1679: 235-249
- [13] Devaux P. Production of wheat doubled haploids through intergeneric hybridization with maize. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2021, 2287: 267-279
- [14] Guha S, Maheshwari S C. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. Nature, 1964, 204(4957): 497
- [15] Orcen N, Emiroglu U. Cytological characterization of tobacco plantlets obtained from androgenic haploids through chromosome doubling. Fresenius Environmental Bulletin, 2014, 23(2): 378-381
- [16] Maharani A, Fanata W I D, Laeli F N, Kim K M, Handoyo T. Callus induction and regeneration from anther cultures of indonesian indica black rice cultivar. Journal of Crop Science and Biotechnology, 2020, 23(1): 21-28
- [17] Ohnoutkova L, Vlcko T, Ayalew M. Barley anther culture. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2019, 1900: 37-52
- [18] Chiancone B, Germanà M A. Microspore embryogenesis through anther culture in *Citrus clementina* Hort. ex Tan. Methods in Molecular Biology, 2016, 1359: 475-487
- [19] 胡道芬,汤云莲,袁振东,王敬驹. 冬小麦花粉孢子体的诱导及“京花 1 号”的育成. 中国农业科学, 1983(1): 29-35
Hu D F, Tang Y L, Yuan Z D, Wang J J. The induction of pollen sporophyte of winter wheat and the development of the new variety 'Jinghua No.1'. Scientia Agricultura Sinica, 1983(1): 29-35
- [20] Sadasivaiah R S, Perkovic S M, Pearson D C, Postman B, Beres B L. Registration of AC Andrew wheat. Crop Science, 2004, 44(2): 696-697
- [21] 王成社,李景琦,邹淑芳,杨进荣,刘俊,严文献,黄晓刚. 小麦新品种陕农 28 的选育与花培育种技术的改良. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2002, 30(4): 21-23, 36
Wang C S, Li J Q, Zou S F, Yang J R, Liu J, Yan W X, Huang X G. Discussion on the improvement of haploid breeding from selecting new varieties of Shannong 28. Journal of Northwest Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition, 2002, 30(4): 21-23, 36
- [22] 姚金保,陆维忠. 小麦新品种生选 6 号的丰产稳产性和赤霉病抗性分析. 麦类作物学报, 2012, 32(4): 793-798
Yao J B, Lu W Z. Analysis of yield potential, yield stability and resistance to fusarium head blight of new wheat cultivar Shengxuan 6. Journal of Triticeae Crops, 2012, 32(4): 793-798
- [23] 王炜,杨随庄,叶春雷,陈玉梁,王方,欧巧明,裴怀弟,罗俊杰. 丰产优质花培春小麦新品种——陇春 31 号. 麦类作物学报, 2014, 34(3): 432
Wang W, Yang S Z, Ye C L, Chen Y L, Wang F, Ou Q M, Pei H D, Luo J J. A high yield and good quality spring wheat variety Longchun 31 of anther culture method. Journal of Triticeae Crops, 2014, 34(3): 432
- [24] Lantos C, Bóna L, Nagy E, Békés F, Pauk J. Induction of in vitro androgenesis in anther and isolated microspore culture of different spelt wheat (*Triticum spelta* L.) genotypes. Plant Cell,

- Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2018, 133 (3): 385-393
- [25] 兰素缺, 李光威, 权书月, 李杏普, 刘玉平, 侯红军, 高红欣. 碳源组份及浓度对小麦花药培养和游离小孢子培养的影响. 华北农学报, 2002 (S1): 93-97
Lan S Q, Li G W, Quan S Y, Li X P, Liu Y P, Hou H J, Gao H X. Effects of carbohydrate composition and concentration on anther culture and isolated microspores culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2002 (S1): 93-97
- [26] 赵林姝, 刘录祥, 古佳玉, 谢永盾, 郭会君, 赵世荣, 李军辉, 熊宏春. 冬小麦高花药培养力基因型的筛选. 麦类作物学报, 2017, 37 (10): 1294-1300
Zhao L S, Liu L X, Gu J Y, Xie Y D, Guo H J, Zhao S R, Li J H, Xiong H C. Screening of winter wheat germplasms with high anther culture ability. Journal of Triticeae Crops, 2017, 37 (10): 1294-1300
- [27] 吕学莲, 白海波, 蔡正云, 董建力, 高晓原, 陈雪, 李树华. 小麦花药培养的基因型效应及优良基因型筛选. 中国农学通报, 2011, 27 (33): 13-17
Lv X L, Bai H B, Cai Z Y, Dong J L, Gao X Y, Chen X, Li S H. Effect of genotype on wheat anther culture and selection of choiceness genotype. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27 (33): 13-17
- [28] Guan P F, Lu L H, Jia L J, Kabir M R, Zhang J B, Lan T Y, Zhao Y, Xin M M, Hu Z R, Yao Y Y, Ni Z F, Sun Q X, Peng H R. Global QTL analysis identifies genomic regions on chromosomes 4A and 4B harboring stable loci for yield-related traits across different environments in wheat (*Triticum aestivum* L.). Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 529-546
- [29] Xu X T, Zhu Z W, Jia A L, Wang F J, Wang J P, Zhang Y L, Fu C, Fu L P, Bai G H, Xia X C, Hao Y F, He Z H. Mapping of QTL for partial resistance to powdery mildew in two Chinese common wheat cultivars. Euphytica, 2020, 216 (1): 3-14
- [30] Xu Q, Xu F C, Qin D D, Li M F, Fedak G, Cao W G, Yang L J, Dong J. Molecular mapping of QTLs conferring fusarium head blight resistance in Chinese wheat cultivar Jingzhou 66. Plants (Basel), 2020, 9 (8): 1021-1035
- [31] 高洁, 王姣, 张淑娟, 郭栋, 李玉莲, 宋国琦, 陈雪燕, 李根英. 以花药为受体的小麦转基因技术体系的构建. 山东农业科学, 2014, 46 (1): 1-5, 18
Gao J, Wang J, Zhang S J, Guo D, Li Y L, Song G Q, Chen X Y, Li G Y. Construction of wheat transgenic technology system using isolated anthers as particle bombardment receptor. Shandong Agricultural Sciences, 2014, 46 (1): 1-5, 18
- [32] Han Y, Broughton S, Liu L, Zhang X Q, Zeng J B, He X Y, Li C D. Highly efficient and genotype-independent barley gene editing based on anther culture. Plant Communications, 2020, 2 (2): 100082-100094
- [33] Broughton S. Ovary co-culture improves embryo and green plant production in anther culture of Australian spring wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2008, 95 (2): 185-195
- [34] 李光威, 兰素缺, 孙宝启. 小麦游离小孢子培养的研究. 华北农学报, 2001 (1): 83-87
Li G W, Lan S Q, Sun B Q. Study on isolated microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2001 (1): 83-87
- [35] 张丽. 小麦花药及游离小孢子培养研究. 咸阳: 西北农林科技大学, 2013
Zhang L. Study on the anther culture and microspore culture in wheat. Xianyang: Northwest A&F University, 2013
- [36] 陈学虎, 陈耀锋, 王丽, 杨德勇, 张月琴, 王娜. 基因型和 2, 4-D 浓度对小麦不同外植体离体培养特性的影响. 麦类作物学报, 2013, 33 (3): 450-454
Chen X H, Chen Y F, Wang L, Yang D Y, Zhang Y Q, Wang N. Study on the effects of genotypes and 2, 4-D concentration on in vitro culture traits of explants. Journal of Triticeae Crops, 2013, 33 (3): 450-454
- [37] 张伟, 尹米琦, 赵佩, 王轲, 杜丽璞, 叶兴国. 我国部分主推小麦品种组织培养再生能力评价. 作物学报, 2018, 44 (2): 208-217
Zhang W, Yin M Q, Zhao P, Wang K, Du L P, Ye X G. Regeneration capacity evaluation of some largely popularized wheat varieties in China. Acta Agronomica Sinica, 2018, 44 (2): 208-217
- [38] 王炜, 陈琛, 叶春雷, 贺小宝, 杜旺喜, 王云贵, 杨芳萍, 杨文雄, 杨随庄, 王方, 罗俊杰. 甘肃主栽小麦品种及骨干亲本花药培养特性评价及分析. 核农学报, 2016, 30 (6): 1059-1066
Wang W, Chen C, Ye C L, He X B, Du W X, Wang Y G, Yang F P, Yang W X, Yang S Z, Wang F, Luo J J. Evaluation and analysis of anther culture characteristics in Gansu wheat cultivars and backbone parents. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2016, 30 (6): 1059-1066