

网络出版时间:2024-08-20

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1359.S.20240819.1404.010

小麦 DH 系创制中培养基、秋水仙浓度的筛选及其 HMW-GS 组成分析

毕珍珍¹, 郑艳¹, 李辉¹, 李晓建¹, 刘雯¹, 母学荣¹,
朱娜¹, 郑佳乐¹, 宋瑜龙¹, 闵东红¹, 张小红²

(1. 西北农林科技大学农学院/旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西杨凌 712100;

2. 西北农林科技大学生命科学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 为了提高小麦 DH 系创制效率, 以 11 个小麦杂交组合的 F₁ 代作为材料, 比较分析了两种培养基 (NPB-99 和 CHB) 下小麦花药的诱导效率以及三种浓度秋水仙素处理 (4、6 和 8 g · L⁻¹) 下单倍体的染色体加倍效率, 并利用 SDS-PAGE 对获得的 DH 株系进行优质亚基检测。结果表明, CHB 培养基花药诱导效率优于 NPB-99 培养基。在三种秋水仙素浓度中, 6 g · L⁻¹ 诱导单倍体加倍的效率最高。在所获得的 33 个 DH 系中共鉴定出 16 个株系携带优质亚基组合 (1/7+8/5+10 或 1/7+9/5+10), 且具有较好的烘焙品质, 可作为小麦品质育种的种质资源。

关键词: 小麦; 花药培养; DH 系; HMW-GS

中图分类号: S512.1; S330

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2025)04-0432-08

Screening of Culture Medium and Concentration of Colchicine for Construction of Wheat DH Lines and Their HMW-GS Composition Analysis

BI Zhenzhen¹, ZHENG Yan¹, LI Hui¹, LI Xiaojian¹, LIU Wen¹, MU Xuerong¹,
ZHU Na¹, ZHENG Jiale¹, SONG Yulong¹, MIN Donghong¹, ZHANG Xiaohong²

(1. College of Agronomy, Northwest A&F University/ State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Area, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to improve the construction of wheat DH lines, the F₁ generation of 11 wheat hybrid combinations was used as materials to compare and analyze the induction efficiency of wheat anthers under two media (NPB-99 and CHB) and the chromosome doubling efficiency of haploids under three concentrations of colchicine treatments (4, 6 and 8 g · L⁻¹). The high-molecular-weight glutenin subunits (HMW-GS) of the obtained DH lines were identified by SDS-PAGE. The results showed that the anther induction efficiency of CHB medium was better than that of NPB-99 medium. The concentration of 6 g · L⁻¹ colchicine was more efficient in inducing haploid doubling. A total of 16 lines carrying prior HMW-GS combinations (1/7+8/5+10 or 1/7+9/5+10) were identified from the 33 DH lines, with good baking quality, which could provide genetic resources for subsequent wheat quality breeding research.

Keywords: Wheat; Anther culture; Double haploid; HMW-GS

麦谷蛋白是小麦贮藏蛋白的主要成分之一, 主要由高分子量谷蛋白亚基 (high-molecular-

收稿日期: 2024-03-18

修回日期: 2024-04-23

基金项目: 科技创新 2030-重大项目 (2023ZD0402601)

第一作者 E-mail: 15538238775@163.com (毕珍珍)

通讯作者 E-mail: mdh2493@126.com (闵东红); zhxx2493@126.com (张小红)

weigh glutenin subunits, HMW-GS) 和低分子量谷蛋白亚基 (low-molecular-weight glutenin subunits, LMW-GS) 组成^[1]。其中, HMW-GS 是决定小麦加工品质、面团流变学特性及面团微结构的重要因素^[2], 选育出具有优质亚基组合类型的小麦是育种者的目标之一^[3]。控制小麦 HMW-GS 的基因位于小麦第一同源染色体的长臂上, 统称为 *Glu-1* 位点, 包括 *Glu-A1*、*Glu-B1* 和 *Glu-D1*^[4]。HMW-GS 基因的等位变异、组合、相对表达量显著影响面粉的最终用途^[2]。通过遗传育种有目的地改良小麦 HMW-GS 的组成, 通常需要遗传纯系。双单倍体 (double haploid, DH) 技术可以从杂合子亲本中一步产生纯合子, 而且优良性状可以稳定遗传, 后代不会发生性状分离, 因而可根据育种目标从群体中选择优良的纯系^[5], 育种效率明显优于采用 7~8 代自交的传统育种方法。

单倍体诱导和随后的基因组加倍是 DH 技术所需的两个主要步骤^[6]。自 1971 年中国科学院遗传所首次获得小麦单倍体花粉植株以来^[7], 应用花药培养技术进行小麦品种改良受到人们的普遍重视^[8]。相关学者相继对影响小麦花药培养的因素、单倍体植株加倍技术等进行了研究, 使这项技术逐渐趋于成熟, 并与常规育种技术、远缘杂交技术、诱变技术和转基因技术相结合, 在种质资源创制、育种等方面发挥了积极作用^[9-15]。该技术通常包含脱分化、再分化等几个培育程序, 需要大量的体外操作, 培养成本高。为进一步提高花药培养效率和简化培养程序, 国内外的科学家希图建立起一种更为简便、快速、高效的一步成苗培养法^[16]。目前该项技术研究已有突破, 绿苗诱导率可达到与常规的多步成苗法相当的水平^[17]。但花药培养在具体应用中存在一些问题, 如愈伤诱导率还不够高, 一步成苗频率较低且可重复性较差, 染色体加倍率较低, 尤其是供体材料的基因型对于花药培养效率的影响较大^[11, 18]。因此, 对小麦花药培养过程中的影响因素进行研究, 开发更高效的花药培养系统, 对小麦 DH 系的创制具有重要意义。本研究以 11 个小麦杂交组合的 F₁ 代材料, 比较分析两种培养基 (NPB-99 和 CHB) 下小麦花药的诱导效率以及三种浓度秋水仙素处理 (4、6 和 8 g · L⁻¹) 下单倍体的染色体加倍效率, 并利用 SDS-PAGE 对获得的 DH 株系进行优质亚基检测, 以期对小麦 DH 技术优化以及该技

术在优质育种上的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

花药离体培养的材料选自本实验室 2021—2022 年种植于陕西省咸阳市杨陵区 11 个杂交组合的 F₁ 代植株 (表 1)。

表 1 试验材料

Table 1 Wheat materials tested

| 序号 Serial number | 杂交组合 Hybrid combination | 代号 Code |
|---------------------|--|------------|
| 1 | 藁优 5218/小偃 22 Gaoyou 5218/Xiaoyan 22 | Q1 |
| 2 | 小偃 22/藁优 5218 Xiaoyan 22/Gaoyou 5218 | Q2 |
| 3 | 师栾 02-1/周麦 18 Shiluan 02-1/Zhoumai 18 | Q9 |
| 4 | 周麦 18/师栾 02-1 Zhoumai 18/Shiluan 02-1 | Q10 |
| 5 | 小偃 22/济麦 44 Xiaoyan 22/Jimai 44 | Q15 |
| 6 | 济麦 44/小偃 22 Jimai 44/Xiaoyan 22 | Q16 |
| 7 | 新麦 26/周麦 18 Xinmai 26/Zhoumai 18 | Q20 |
| 8 | 郑麦 103/新麦 26 Zhengmai 103/Xinmai 26 | Q23 |
| 9 | 新麦 26/郑麦 103 Xinmai 26/Zhengmai 103 | Q24 |
| 10 | 郑麦 103/济麦 44 Zhengmai 103/Jimai 44 | Q25 |
| 11 | 济麦 44/郑麦 103 Jimai 44/Zhengmai 103 | Q26 |

1.2 试验方法

1.2.1 取材及预处理

2021 年 10 月种植 F₁ 杂交后代, 正常进行田间管理。次年 4 月初小麦进入孕穗期后, 用 DA-PI 对小孢子染色确定材料发育时期^[19]。当麦穗中大部分小孢子处于单核靠边期, 从小麦穗下第二茎节处将麦穗折下, 用黑色塑料袋包裹严实, 带回实验室。将茎秆修剪到合适的长度, 基部浸泡于蒸馏水中, 置于 4 °C 黑暗条件下, 低温预处理 12 d。

1.2.2 材料的消毒与接种

从低温预处理过的材料中剥出完整幼穗, 75%乙醇消毒 1 min, 再用 0.1% 的升汞 (HgCl₂) 溶液震荡消毒 5 min, 最后用无菌蒸馏水将麦穗冲洗干净。用镊子将幼穗中部的花药轻轻地取

下,接种于 NPB-99^[20]、CHB^[21] 两种诱导培养基上。NPB-99 和 CHB 培养基均为半固体培养基,附加 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 植物凝胶(pH5.8),CHB 培养基还附加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT^[22]。

1.2.3 花药培养

将接种过花药的培养基置于 BSG-400 型号的光照培养箱中,32 °C 下暗培养 3 d。然后,将培养基转移至组培室,26 °C 暗培养至愈伤形成。30 d 后培养基表面愈伤组织生长良好,部分花粉胚形成并直接萌发形成幼苗,此时揭去遮光帘,室内自然光下继续培养。45 d 后统计每瓶中接种花药数量、愈伤组织数量、绿苗数量、白苗数量,并计算愈伤组织诱导率、绿苗率和白苗率。愈伤组织诱导率=愈伤组织块数/接种花药数 $\times 100\%$;绿苗率=绿苗数/接种花药数 $\times 100\%$;白苗率=白苗数/接种花药数 $\times 100\%$ 。

1.2.4 生根与壮苗培养

将得到的绿苗转入生根培养基^[23],置于组培室进行生根培养,培养温度 26 °C,光照强度 2 000 Lx,光照时间 16 h/8 h(昼/夜),待绿苗生长出 2 cm 左右根系时,即可转入附加 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 多效唑的 MS 基本培养基。绿苗在原环境壮苗培养一周后,转移到春化培养箱,4 °C 春化 30 d。

1.2.5 单倍体的鉴定

取 1 g 左右的小麦叶片,在预冷培养皿中加入 1.5 mL MgSO_4 裂解液^[24],用刀片朝一个方向切,材料被切成薄片;接着用 400 目的滤膜将培养皿内的解离液过滤到 1.5 mL 离心管中,置于 4 °C 冰箱中,孵育 5 min;之后 4 °C、 $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清后再加入 100 μL 预冷的解离液和 150 μL 预冷的 DAPI 染料($4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),置于冰上避光染色 10 min^[25]。将制备好的样品装入 CytoFLEX 型号的流式细胞仪并记录数据。

1.2.6 单倍体加倍

春化后,将含有健壮幼苗的锥形瓶置于室温下缓苗一段时间。接着配制浓度为 4、6 和 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素溶液,溶液过滤除菌后,向每瓶(250 mL 锥形瓶)培养基表面添加 2 mL 无菌秋水仙素溶液,20 °C 黑暗条件下处理 12 h,处理结束后,将材料从培养基中取出,在流动自来水下冲洗 4~6 h,移栽到温室。此时幼苗要注意遮荫保湿,待其从秋水仙素毒害效应缓解后,转为常规的小麦温

室栽培管理。统计存活株数和结实株数,并计算加倍率和成活率。加倍率=加倍后结实株数/加倍处理的单倍体苗数 $\times 100\%$;成活率=加倍后存活株数/加倍处理的单倍体苗数 $\times 100\%$ 。

1.2.7 DH 株系 HMW-GS 组成

DH 单株(DH₀)的籽粒收获后,用 1.5% H_2O_2 处理 24 h,种植于西北农林科技大学小麦试验田,每行播种 30 粒种子,行长 1.5 m,行间距 0.2 m。2023 年 6 月收获株系,提取 33 个株系籽粒中的麦谷蛋白,以中国春和师栾 02-1 为对照,用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对 DH 小麦的 HMW-GS 组成进行检测分析^[3]。

1.2.8 DH 株系品质测定

采用丹麦 FOSS 分析仪器公司生产的 KjeltecTM 8400 全自动凯氏定氮仪测定籽粒粗蛋白含量;采用瑞典波通公司的 GM 2200 型号的面筋数量与质量测定系统测定材料湿面筋含量;沉淀值按照 NY/T 1095-2006 测定。

1.3 数据统计与分析

用 Excel 2021、SPSS 2019 软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对花药诱导效率的影响

11 种供试材料在 CHB 培养基上的愈伤组织诱导率为 6.74%~42.95%,在 NPB-99 培养基上的愈伤组织诱导率为 6.59%~37.92%,CHB 培养基的愈伤组织诱导率平均值(26.65%)约为 NPB-99 培养基(19.14%)的 1.39 倍(表 2)。诱导过程中,CHB 和 NPB-99 培养基均出现了花药一步成苗的现象(图 1),绿苗率分别为 0.05%~3.56%和 0.13%~2.15%,平均值分别为 1.28%和 0.97%(表 2),且 CHB 培养基在诱导过程较早出现了愈伤和芽苗(图 1A),然而存在的不足是白化苗比例(1.67%)也相对较高。综合分析来看,CHB 培养基诱导效率较高。

2.2 不同秋水仙素浓度下单倍体加倍的效果

经流式细胞仪检测,单倍体植株的 DNA 含量位于 110 道附近(图 2A),DH 植株的 DNA 含量位于 220 道附近(图 2B)。因此,可以经流式细胞仪检测实现单倍体植株和 DH 植株的鉴定,进而用于秋水仙素加倍效果评价。

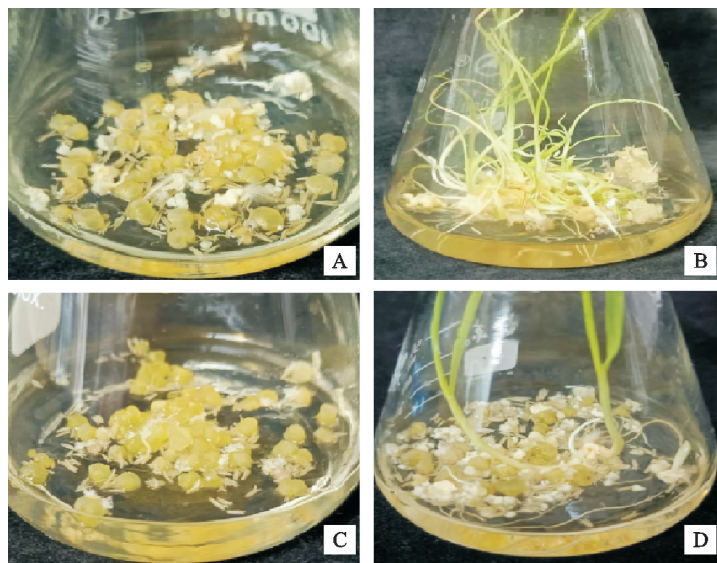
表 2 不同培养基对小麦花药诱导效率的影响

Table 2 Effect of different media on anther induction efficiency of wheat

| 基因型 Genotype | CHB | | | | NPB-99 | | | |
|-----------------|---|--|------------------------------|-------------------------------------|---|--|------------------------------|-------------------------------------|
| | 接种花药数 Number of anthers inoculated | 愈伤组织诱导率 Callus induction rate/% | 绿苗率 Green plant rate/% | 白苗率 Albino seedling rate/% | 接种花药数 Number of anthers inoculated | 愈伤组织诱导率 Callus induction rate/% | 绿苗率 Green plant rate/% | 白苗率 Albino seedling rate/% |
| Q1 | 701 | 32.20abc | 1.03ab | 0.98a | 1659 | 27.05bcd | 0.41ab | 0.68ab |
| Q2 | 746 | 27.38abc | 0.85ab | 2.53a | 1338 | 10.05ab | 0.78abc | 0.61ab |
| Q9 | 2 515 | 40.70bc | 0.90ab | 0.49a | 2 168 | 37.92d | 1.64cd | 1.57abc |
| Q10 | 1436 | 25.70abc | 0.80ab | 1.14a | 1 968 | 20.45abc | 0.77abc | 0.86abc |
| Q15 | 405 | 18.13abc | 2.14bc | 0.55a | 874 | 14.70abc | 1.41bcd | 1.90abc |
| Q16 | 1019 | 42.95c | 3.56c | 5.87b | 1 030 | 30.22cd | 2.15d | 2.54c |
| Q20 | 1 531 | 11.90ab | 0.05a | 0.87a | 2 488 | 10.67ab | 0.13a | 1.45abc |
| Q23 | 781 | 6.74a | 0.27ab | 0.27a | 1 122 | 15.84abc | 0.49ab | 0.31a |
| Q24 | 1 140 | 22.64abc | 0.47ab | 0.74a | 2873 | 10.93ab | 1.38bcd | 0.73ab |
| Q25 | 969 | 32.85abc | 2.28bc | 2.53a | 1 198 | 26.07bcd | 1.07abcd | 2.31bc |
| Q26 | 1 110 | 31.96abc | 1.69abc | 2.40a | 3410 | 6.59a | 0.40ab | 0.67ab |
| 平均值 Mean | 1 123 | 26.65 | 1.28 | 1.67 | 1 830 | 19.14 | 0.97 | 1.24 |

同列数值后不同字母表示存在显著性差异(采用 Duncan 法, $P < 0.05$)。下同。

Different letters after the values within the same columns indicate significant differences(Duncan method, $P < 0.05$). The same below.



A~B: 在 CHB 培养基上培养 28 d、45 d 时,愈伤组织生长及花药一步成苗情况; C~D: 在 NPB-99 培养基上培养 28 d、45 d 时,愈伤组织生长及花药一步成苗情况。

A—B: When cultured on CHB medium for 28 d and 45 d, callus growth and anther one-step seedling formation; C—D: When cultured on NPB-99 medium for 28 d and 45 d, callus growth and anther one-step seedling formation.

图 1 基因型 Q9 花药在不同培养基上的培养情况

Fig. 1 Culture of genotype Q9 anthers on different media

用浓度为 4、6 和 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素溶液处理 320 株单倍体植株后,存活 73 株,加倍成功 33 株,加倍率为 2.20%~17.62%,成活率为 11.71%~32.39%(表 3)。在不同浓度的秋水仙素处理下,单倍体植株的成活率、加倍率均存在显著差异。用 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理后,单倍体植株的成活率为 32.39%,加倍率为 2.20%,虽然植

株成活率高,但加倍效率低; $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理后,单倍体植株的成活率为 11.71%,加倍率为 7.12%,虽然存活下来的植株大都能被成功加倍,但植株存活率低,加倍效率不高; $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理后,单倍体植株的成活率为 30.79%,加倍率为 17.62%,加倍率效率高于其他两个处理。

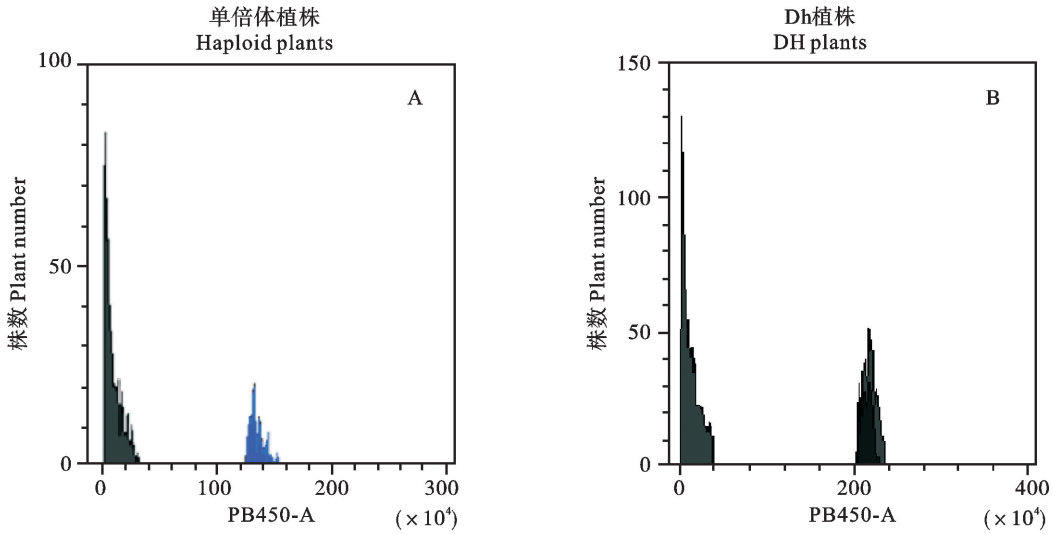


图 2 流式细胞仪检测结果
Fig. 2 Results of flow cytometry analysis

表 3 不同浓度下秋水仙素加倍效率差异

Table 3 Doubling efficient of colchicine with different concentrations

| 浓度 Concentration/ (g · L ⁻¹) | 处理株数 Number of plants treated | 成活株数 Number of surviving plants | 结实株数 Number of fruiting plants | 成活率 Survival rate/% | 加倍率 Doubling rate/% |
|--|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|------------------------|
| 4 | 101 | 32 | 4 | 32.39b | 2.20a |
| 6 | 109 | 27 | 19 | 30.79b | 17.62b |
| 8 | 110 | 14 | 10 | 11.71a | 7.12a |

2.3 DH 后代群体中 HMW-GS 的类型和频率分布

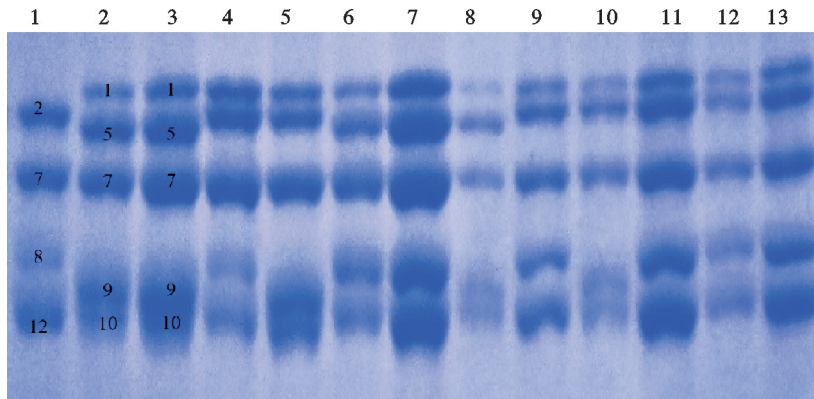
经 SDS-PAGE 检测,对花药培养获得的 33 个株系在 3 个位点上共鉴定出 1、7+8、7+9、5+10 和 2+12 等 5 种类型 HMW-GS(图 3)。在 *Glu-A1* 位点上,1 亚基出现的频率最高,占 100%;在 *Glu-B1* 位点上,7+8 和 7+9 亚基出现的频率分别为 42.42% 和 57.58%;在 *Glu-D1* 位点上,5+10 和 2+12 亚基出现频率为 48.48% 和 51.52%。这些亚基在 DH 株系中形成 4 种不同的 HMW-GS 组合类型(表 4)。其中,亚基组合为 1/7+8/5+10 的 DH 株系有 7 个;亚基组合为 1/7+9/2+12 的 DH 株系有 10 个;亚基组合为 1/7+8/2+12 的 DH 株系有 7 个;亚基组合为 1/7+9/5+10 的 DH 株系有 9 个。根据 HMW-GS 评分标准^[26],10 分的亚基组合为(1/7+8/5+10),9 分的亚基组合为(1/7+9/5+10),均较优的亚基组合。DH 株系中含有两种亚基组合的比例分别为 21.21% 和 27.27%,说明所获得 DH 株系中优质株系比例较高,可用于小麦品质改良。

表 4 DH 株系亚基组合类型及分布比例

Table 4 Combination types and distribution ratio of DH subunits

| 亚基组合类型 HMW-GS combination type | 样本数 Sample size | 比例 Ratio/% |
|--------------------------------------|--------------------|---------------|
| 1/7+8/2+12 | 7 | 21.21 |
| 1/7+9/2+12 | 10 | 30.30 |
| 1/7+8/5+10 | 7 | 21.21 |
| 1/7+9/5+10 | 9 | 27.27 |

经过品质分析,16 份具有优质亚基组合的 DH 系的籽粒粗蛋白含量、湿面筋含量和沉淀值分别为 13.03%~15.61%、28.10%~34.89% 和 35.05~41.19 mL(表 5),均达到了中强筋小麦品质标准(GB/T 17320-2013)(蛋白质含量 ≥ 13.00%,湿面筋含量 ≥ 28%,沉淀值 ≥ 35 mL),进一步说明这 16 份材料具有较好的营养和加工品质,可为后续的品质育种研究提供种质资源。



1: 中国春; 2: 师乐 02-1; 3~13: 部分 DH 株系。

1: Chinese Spring; 2: Shiluan 02-1; 3-13: Some DH lines.

图3 部分 DH 系籽粒 HMW-GS 电泳图

Fig. 3 Electrophoretic map of HMW-GS in grains of partial DH wheat lines

表5 具有优质亚基组合的种质资源

Table 5 Germplasm resources with high quality subunit combination

| 株系 Line | 亚基组合类型 HMW-GS combination type | 粗蛋白含量 Crude protein content/% | 沉淀值 Zeleny sedimentation value/mL | 湿面筋含量 Wet gluten content/% |
|------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| Q9-1 | 1/7+8/5+10 | 13.92±0.13 | 38.37±0.12 | 29.65±0.29 |
| Q9-2 | 1/7+8/5+10 | 14.06±0.26 | 38.77±0.11 | 29.89±0.45 |
| Q9-13 | 1/7+8/5+10 | 15.19±0.08 | 41.19±0.14 | 32.95±0.09 |
| Q9-14 | 1/7+8/5+10 | 13.26±0.38 | 37.65±0.30 | 28.67±0.56 |
| Q10-1 | 1/7+8/5+10 | 14.74±0.10 | 39.43±0.12 | 31.41±0.21 |
| Q16-1 | 1/7+8/5+10 | 15.61±0.34 | 40.23±0.33 | 34.89±0.54 |
| Q26-1 | 1/7+8/5+10 | 14.42±0.31 | 38.95±0.39 | 32.35±0.13 |
| Q1-1 | 1/7+9/5+10 | 13.57±0.12 | 37.46±0.04 | 29.21±0.11 |
| Q1-2 | 1/7+9/5+10 | 13.97±0.09 | 40.06±0.05 | 28.90±0.17 |
| Q9-4 | 1/7+9/5+10 | 14.25±0.24 | 39.39±0.23 | 30.81±0.34 |
| Q24-1 | 1/7+9/5+10 | 13.03±0.27 | 35.05±0.22 | 28.10±0.09 |
| Q24-4 | 1/7+9/5+10 | 14.74±0.34 | 40.14±0.48 | 31.48±0.67 |
| Q24-5 | 1/7+9/5+10 | 14.96±0.31 | 40.65±0.08 | 32.33±0.57 |
| Q24-9 | 1/7+9/5+10 | 13.74±0.05 | 35.56±0.16 | 30.86±0.09 |
| Q24-11 | 1/7+9/5+10 | 13.49±0.17 | 36.61±0.15 | 30.01±0.40 |
| Q25-2 | 1/7+9/5+10 | 13.91±0.19 | 35.16±0.23 | 29.53±0.20 |

3 讨论

3.1 小麦花药培养一步成苗

花药一步成苗可以让离体培养的花药组织的花粉细胞在一种培养基上同时完成脱分化和再分化过程,直接分化出完整植株。有研究发现,小麦花药在液体培养基 W14GD(W14 添加 0.5 mg · L⁻¹ 2,4-D 及 40 g · L⁻¹ 葡萄糖)和 W14Gd(W14 添加 0.5 mg · L⁻¹ 毒锈啉及 40 g · L⁻¹ 葡萄糖)上,28 °C 暗培养 35 d 左右可直接成苗,成苗率为 0.17%~1.02%^[11]。在 CHB 培养基中添加 0.5

mg · L⁻¹ 2,4-D 及 0.5 mg · L⁻¹ KT 后,有花粉胚的形成并直接萌发形成具胚芽鞘、根和叶的健壮苗,成苗率为 0.26%~1.74%^[22]。此外,苯乙酸(phenylacetic acid, PAA)也具有促进花药愈伤组织直接分化成苗的潜力,在诱导培养基中附加 PAA 能有效地促进花药愈伤组织直接分化成苗^[16]。本研究花药培养过程中 NPB-99 和 CHB 培养基均能使花药一步成苗,绿苗率分别为 0.13%~2.15%和 0.05%~3.5%。对于 CHB 培养基添加 0.5 mg · L⁻¹ 2,4-D 和 0.5 mg · L⁻¹ KT 后花药一步成苗原因已有研究;而 NPB 培养基上的

小麦花药一步成苗可能是因为含有利于小麦花药一步成苗的植物激素 2,4-D、KT 和 PAA。利用花药一步培养成苗法,可缩短培养周期,获得绿苗质量高,移栽后生长快且健壮;获得的愈伤也可继续进行分化培养,产生更多单倍体植株。目前小麦一步成苗技术还不够成熟,成苗率较低。因此,进一步探索花药一步成苗技术,提高花药培养效率,对小麦 DH 系的创制具有重要意义。

3.2 培养基表面添加秋水仙素加倍效率

染色体加倍是获得纯合子和稳定的二倍体植株的必要条件^[27]。秋水仙碱最初是从秋水仙的种子和球茎中提取的,长期以来一直用于单倍体植物的人工基因组加倍^[28]。常用的秋水仙素浸泡分蘖节法需要大量的秋水仙素溶液且工作量较大,培养基表面添加秋水仙素不仅能获得较高的加倍效率,而且操作流程简单^[29]。本研究中,相比于 $4\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $8\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的秋水仙素处理, $6\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理的加倍率效率较高,单倍体植株的成活率为 30.79%,加倍率为 17.62%。因此,在培养基表面添加 $6\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素可有效实现单倍体植株染色体加倍,并获得较高的加倍率效率。

3.3 DH 系 HMW-GS 组成研究

高分子量麦谷蛋白亚基组成的分析和鉴定是小麦种质资源遗传多样性的评估^[30]、优质品种(系)选育、推广种植和加工生产的重要基础工作^[31-33]。鉴定小麦 HMW-GS 组成的方法有很多,如 SDS-PAGE、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)、PCR 分子标记法等^[2]。其中,SDS-PAGE 操作简单、经济,是 HMW-GS 检测的常用方法。本研究采用 SDS-PAGE 对花药培养获得的 33 个株系进行了检测,这些株系均聚合有 4 个以上的亚基。其中拥有优质亚基组合类型(1/7+8/5+10 和 1/7+9/5+10)的 DH 株系有 16 个,进一步还需要对这 16 份材料进行多年多点的表型性状鉴定及品质检测,为 HMW-GS 标记在小麦育种实践的应用提供支持。

参考文献:

- [1] ZHAO J, ZHENG X, QIAO L, *et al.* Effects of HMW-GSs on quality related traits in wheat (*Triticum aestivum* L.) under different water regimes [J]. *PLoS One*, 2020, 15(8): e0237711.
- [2] 温亮, 龙小玲, 周正富, 等. 小麦高分子量麦谷蛋白亚基基因功能标记研究进展[J]. 分子植物育种, 2020, 18(17): 5813.
- WEN L, LONG X L, ZHOU Z F, *et al.* Review on functional markers for HMW-GS genes in wheat [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2020, 18(17): 5813.
- [3] 刘洋. 小麦分离后代主要品质性状微量快速检测及其在品种改良中应用[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2023.
- LIU Y. Micro rapid detection of main quality traits in wheat segregated progeny and its application in variety improvement [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2023.
- [4] PAYNE P I, LAWRENCE G J. Catalogue of alleles for the complex gene loci, *Glu-A1*, *Glu-B1*, and *Glu-D1* which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat [J]. *Cereal Research Communications*, 1983, 11(1): 29.
- [5] 刘洋, 刘高祥, 丁子俊, 等. 矮抗 58×苏隆 128 的 DH 遗传群体创建[J]. 滁州学院学报, 2022, 24(2): 50.
- LIU Y, LIU G X, DING Z J, *et al.* Establishment of DH genetic population from AK 58×Sulong 128 [J]. *Journal of Chuzhou University*, 2022, 24(2): 50.
- [6] REN J, WU P, TRAMPE B, *et al.* Novel technologies in doubled haploid line development [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(11): 1361.
- [7] 刘文轩. 我国小麦花药培养研究概况与展望[J]. 麦类作物学报, 1990, 10(5): 43.
- LIU W X. General situation and prospect of wheat anther culture in China [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 1990, 10(5): 43.
- [8] 任慧莉, 李春莲, 秦震霓, 等. 基因型及外源因子对小麦花药培养一步成苗的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(4): 13.
- REN H L, LI C L, QIN Z N, *et al.* Effect of genotype and extrafactor on forming seedling through one-step culture in anther culture of wheat [J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2002, 30(4): 13.
- [9] 董艳辉, 赵兴华, 李亚莉, 等. 小麦花药培养各种影响因素的研究进展[J]. 山西农业科学, 2018, 46(1): 135.
- DONG Y H, ZHAO X H, LI Y L, *et al.* Research progress on various influence factors of wheat anther culture [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2018, 46(1): 135.
- [10] 宋运贤, 周素英, 杜雪玲, 等. 小麦花药培养效率的影响因素研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(5): 62.
- SONG Y X, ZHOU S Y, DU X L, *et al.* Study on the factors affecting the anther culture efficiency of wheat [J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2012, 40(5): 62.
- [11] 韩晓峰, 陶丽莉, 殷桂香, 等. 基因型和环境条件对小麦花药培养效果的影响[J]. 作物学报, 2010, 36(7): 1209.
- HAN X F, TAO L L, YIN G X, *et al.* Effect of genotype and growing environment on anther culture in wheat [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2010, 36(7): 1209.
- [12] SHARMA P, CHAUDHARY H K, MANOJ N V, *et al.* New protocol for colchicine induced efficient doubled haploidy in haploid regenerants of tetraploid and hexaploid wheats at in vitro level [J]. *Cereal Research Communications*, 2019, 47(2): 356.

- [13] SHRESTHA S, KOO D H, EVERS B, *et al.* Wheat doubled haploids have a marked prevalence of chromosomal aberrations [J]. *The Plant Genome*, 2023, 16(2): e20309.
- [14] SORIANO M, CISTUÉ L, VALLÉS M P, *et al.* Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2007, 91(3): 225.
- [15] 王 炜, 叶春雷, 杨随庄, 等. 花药培养技术在小麦种质资源创制及育种中的应用[J]. 中国种业, 2018(11): 25.
WANG W, YE C L, YANG S Z, *et al.* Application of anther culture technique in wheat germplasm creation and breeding [J]. *China Seed Industry*, 2018(11): 25.
- [16] 卓丽圣, 斯华敏, 程式华, 等. 苯乙酸促进水稻花药愈伤组织的再分化和直接成苗[J]. 中国水稻科学, 1996, 10(1): 37.
ZHUO L S, SI H M, CHENG S H, *et al.* Phenylacetic acid promotes redifferentiation and direct seedling formation of rice anther callus [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 1996, 10(1): 37.
- [17] 陈耀锋, 李春莲, 任慧莉, 等. 小麦花药一步成苗培养方法: CN101554136A[P]. 2009-10-14.
CHEN Y F, LI C L, REN H L, *et al.* Method of wheat anther culture through one-step forming seedling: CN101554136A [P]. 2009-10-14.
- [18] 刘宁涛. 小麦花药培养效率改进和基因型筛选研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
LIU N T. Study on the improvement of culture efficiency and genotypes screening in the anther culture of wheat [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013.
- [19] 高润红, 郭桂梅, 何 婷, 等. 大麦旗叶距对小孢子发育时期、愈伤组织诱导以及绿苗再生的影响[J]. 南京农业大学学报, 2021, 44(1): 36.
GAO R H, GUO G M, HE T, *et al.* Effects of the flag leaf space on microspore developmental stage, callus induction and green plant regeneration in barley [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2021, 44(1): 36.
- [20] LIU W, ZHENG M Y, POLLE E A, *et al.* Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis [J]. *Crop Science*, 2002, 42(3): 686.
- [21] 孙敬三, 朱至清. 植物细胞工程实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 366.
SUN J S, ZHU Z Q. Experimental technology of plant cell engineering [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 366.
- [22] 张小红, 许鹏博, 薛飞洋, 等. 提高冬小麦花药愈伤组织诱导效率的研究[J]. 种子, 2012, 31(12): 14.
ZHANG X H, XU P B, XUE F Y, *et al.* Research on improvement of callus induction efficiency in anther culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Seed*, 2012, 31(12): 14.
- [23] EUDES F, ACHARYA S, LAROCHE A, *et al.* A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 73(2): 147.
- [24] 孙永星, 李素花, 魏小丽, 等. 适合流式细胞仪分析的小麦细胞核提取方法比较[J]. 生物学杂志, 2012, 29(3): 88.
SUN Y X, LI S H, WEI X L, *et al.* Compare of extraction of wheat seedlings' nucleus suitable for analysis by flow cytometry [J]. *Journal of Biology*, 2012, 29(3): 88.
- [25] 田新民, 周香艳, 弓 娜. 流式细胞术在植物学研究中的应用——检测植物核 DNA 含量和倍性水平[J]. 中国农学通报, 2011, 27(9): 21.
TIAN X M, ZHOU X Y, GONG N. Applications of flow cytometry in plant research—Analysis of nuclear DNA content and ploidy level in plant cells [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(9): 21.
- [26] PAYNE P I, NIGHTINGALE M A, KRATTIGER A F, *et al.* The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1987, 40(1): 51.
- [27] GUAN X, PENG J, FU D. Technology for production of wheat doubled haploid via maize pollen induction—updated review [J]. *Agronomy*, 2024, 14(2): 375.
- [28] AHMADI B, EBRAHIMZADEH H. *In vitro* androgenesis: Spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants [J]. *Plant Cell Reports*, 2020, 39(3): 299.
- [29] 尹米琦, 张双喜, 范春捆, 等. 不同化学试剂和处理方式加倍小麦单倍体植株的效果[J]. 中国农业科学, 2018, 51(5): 811.
YIN M Q, ZHANG S X, FAN C K, *et al.* Effects of different chemicals and treatment methods on chromosome doubling of haploid wheat plants [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(5): 811.
- [30] CABALLERO L, MARTIN L M, ALVAREZ J B. Intra- and inter-population diversity for HMW glutenin subunits in Spanish spelt wheat [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2004, 51(2): 175.
- [31] 李亚青, 张 楠, 张士昌, 等. 1BL/1RS 易位系 HMW-GS 组成与品质分析[J]. 麦类作物学报, 2019, 39(2): 148.
LI Y Q, ZHANG N, ZHANG S C, *et al.* Analysis on HMW-GS composition and quality properties of 1BL/1RS translocation wheat lines [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2019, 39(2): 148.
- [32] 李玲燕, 杜金哲, 姜 雯, 等. 不同土壤水分对强、弱筋小麦烘焙品质的影响[J]. 华北农学报, 2008, 23(3): 198.
LI L Y, DU J Z, JIANG W, *et al.* Effects of different soil water content on baking quality of strong gluten and weak gluten wheat [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2008, 23(3): 198.
- [33] SHEWRY P R, GILBERT S M, SAVAGE A W J, *et al.* Sequence and properties of HMW subunit 1Bx20 from pasta wheat (*Triticum durum*) which is associated with poor end use properties [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106(4): 744.