

小麦花培高愈伤诱导率基因型筛选及培养基优化

刘晓雨^{1,2}, 薛琛婧^{1,2}, 汪晓璐², 王开², 徐文竞², 祁广², 马朋涛¹, 韩冉², 刘成^{1,2}

(1. 烟台大学生命科学学院, 山东烟台 264000; 2. 山东省农业科学院作物研究所/小麦玉米国家工程研究中心/
小麦育种全国重点实验室/国家盐碱地综合利用技术创新中心/农业部黄淮北部小麦生物学与遗传育种重点实验室/
山东省小麦技术创新中心, 山东济南 250100)

摘要:为了获得高愈伤诱导率小麦及提高小麦花药离体培养效率,利用 W14mf 培养基对 22 份小麦材料进行愈伤诱导率的筛选,同时以 W14mf 培养基为基础,设置不同添加浓度的 2,4-D(1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 mg · L⁻¹)、6-BA(0.1、0.2、0.3 和 4.0 mg · L⁻¹)、ABA(0.0、0.2、0.3 和 0.4 mg · L⁻¹) 和阿拉伯半乳糖蛋白(0、10.0、50.0、200.0 和 400.0 mg · L⁻¹),分析激素和碳源对不同小麦基因型愈伤诱导率的影响。结果表明,利用 W14mf 培养基共筛选出 5 份愈伤诱导率 >50% 的材料(济麦 221001、烟农 1212、石麦 366、济麦 35 和烟农 999),其愈伤诱导率分别为 132%、87%、84%、81% 和 76%。仅调整 2,4-D 浓度时,参试材料中济麦 262 愈伤诱导率在 2.0 mg · L⁻¹ 浓度下最大,济麦 38 和济糯 116 愈伤诱导率分别在 1.0 和 1.5 mg · L⁻¹ 浓度下最大。仅调整 6-BA 的添加浓度时,济麦 262 愈伤诱导率在 1.0 mg · L⁻¹ 浓度下最大,济麦 38 和济糯 116 愈伤诱导率分别在 0 和 2.0 mg · L⁻¹ 浓度下最大。仅调整 ABA 的添加浓度时,济麦 4072 愈伤诱导率在 0.2 mg · L⁻¹ 浓度下最大,济南 17 愈伤诱导率在 0 mg · L⁻¹ 浓度下最大。这说明 2,4-D、6-BA 和 ABA 的添加浓度受基因型影响较大,不同品种的添加浓度不同。仅调整阿拉伯半乳糖蛋白(AGP)的添加浓度时,所有参试材料愈伤诱导率在 400.0 mg · L⁻¹ 浓度下均最大,与不添加处理相比,济麦 38 和济麦 4075 的愈伤诱导率分别提升 1.5 和 8.0 倍,济麦 22 愈伤诱导率虽仅为 4.5%,但实现了在培养基 W14mf 上愈伤诱导率零的突破,另外参试的 4 个小麦材料的愈伤诱导率也均提升,说明添加 AGP 可以打破基因型的限制,有效提高小麦花药离体培养的愈伤诱导率。

关键词: 小麦; 花药离体培养; 基因型筛选; 激素; 碳源

中图分类号: S512.1; S330

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2025)12-1620-08

Genotype Screening and Medium Optimization of High Callus Induction Rate in Wheat Anther Culture

LIU Xiaoyu^{1,2}, XUE Chenjing^{1,2}, WANG Xiaolu², WANG Kai²,
XU Wenjing², QI Guang², MA Pengtao¹, HAN Ran², LIU Cheng^{1,2}

(1. College of Life Sciences, Yantai University, Yantai, Shandong 264000, China; 2. Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences/ National Engineering Research Center of Wheat and Maize/ National Key Laboratory of Wheat Breeding/ National Center of Technology Innovation for Comprehensive Utilization of Saline-Alkali Land/ Key Laboratory of Wheat Biology and Genetic Improvement in North Yellow and Huai River Valley, Ministry of Agriculture/ Shandong Wheat Technology Innovation Center, Jinan, Shandong 250100, China)

Abstract: In order to screen for high callus induction rate wheat and improve the efficiency of wheat anther culture *in vitro*, 22 wheat materials were selected for callus induction rate using W14mf medium. Based on W14mf medium, different concentrations of 2,4-D(1.0, 1.5, 2.0, 2.5, and 3.0 mg · L⁻¹),

收稿日期: 2024-12-19 修回日期: 2025-02-27

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2023CXPT016); 国家重点研发计划项目(2023YFD1201005); 山东省科技示范工程项目(2024SFGC0402); 山东省小麦产业技术体系项目(SDAIT-01-01)

第一作者 E-mail: 1215270345@qq.com(刘晓雨)

通讯作者 E-mail: HR022cn@aliyun.com(韩冉)

6-BA(0, 1.0, 2.0, 3.0, and 4.0 mg · L⁻¹), ABA(0, 0.2, 0.3, and 0.4 mg · L⁻¹), and arabinogalactan protein(0, 10.0, 50.0, 200.0, and 400.0 mg · L⁻¹) were added to analyze the effects of hormones and carbon sources on callus induction rate of different wheat genotypes(Jimai 262, Jimai 38, and Jinuo 116). The results showed that five materials with callus induction rates over 50%(Jimai 221001, Yannong 1212, Shimai 366, Jimai 35, and Yannong 999) were screened using W14mf medium, with callus induction rates of 132%, 87%, 84%, 81%, and 76%, respectively. When only adjusting the concentration of 2,4-D, Jimai 262 had the highest callus induction rate in the tested materials at 2.0 mg · L⁻¹, while Jimai 38 and Jinuo 116 had the highest callus induction rates at 1.0 mg · L⁻¹ and 1.5 mg · L⁻¹, respectively. When only adjusting the concentration of 6-BA, Jimai 262 had the highest callus induction rate at 1.0 mg · L⁻¹, while Jimai 38 and Jinuo 116 had the highest callus induction rates at 0 mg · L⁻¹ and 2.0 mg · L⁻¹, respectively. When only adjusting the concentration of ABA addition, the highest callus induction rate was observed for Jimai 4072 at 0.2 mg · L⁻¹, and for Jinan 17 at 0 mg · L⁻¹ addition. The results indicate that the addition levels of 2,4-D, 6-BA, and ABA are greatly influenced by genotype, and the concentrations of addition vary among different varieties. When only adjusting the concentration of arabinogalactan protein(AGP) addition, all tested materials showed the highest callus induction rate at 400.0 mg · L⁻¹, and compared to 0 mg · L⁻¹ addition, the callus induction rate of Jimai 38 and Jimai 4075 were increased by 1.5 and 8.0 times under 400.0 mg · L⁻¹ AGP. The callus induction rate of Jimai 22 was 4.5% under 400.0 mg · L⁻¹ AGP, achieving a breakthrough of 0 callus induction rate in the original culture medium W14mf. In addition, the callus induction rates of the four wheat materials tested were also improved. This result indicates that AGP can break the genotype limitation and effectively improve the callus induction rate of wheat anther culture.

Keywords: Wheat; Anther culture *in vitro*; Genotype screening; Hormones; Carbon source

传统的小麦育种周期较长,一般需要 8~10 年甚至更长时间。花药离体培养(以下简称花培)是加速小麦育种进程最重要的育种技术之一^[1],利用该技术能快速创制出纯合的双单倍体系^[2],进而用于遗传连锁图谱构建、基因精细定位与克隆、遗传育种等研究^[3]。中国自 20 世纪 70 年代末至 80 年代初便开始了小麦花培技术研究,成功培育出花培 5 号^[4]、京花 11 号^[5]、陕农 28^[6]等 50 多个优良小麦品种^[7]并推广应用。尽管小麦花培技术取得了诸多进展,但在实际应用过程中仍面临基因型依赖性、愈伤诱导率低、绿苗分化率低、染色体加倍率低等问题的挑战^[8]。筛选花药愈伤诱导率高的基因型和优化花培培养基是提高小麦愈伤诱导率的两种策略。韩晓峰等^[9]认为,亲本材料中至少一方具备较高的花药愈伤诱导率或较强的花培育种配合力,是提升小麦花培育种效率的关键因素。因此,通过筛选高花药愈伤诱导率的小麦基因型,作为桥梁亲本组配组合,从而建立高效的花培育种技术体系。Karimzadeh 等^[10]比较了 3 种不同培养基,发现只有 W14 培养基具有较高的绿色植株再生率和绿/白化比。W14 培养基最初由欧阳俊闻^[11]提出,随后经过不断地改

良,在实际应用中获得了较好的效果。Barnabas^[12]在 W14 培养基中加入 0.04% 的秋水仙碱,在不进行预处理的情况下提高了中欧和东欧小麦基因型的双单倍体小孢子诱导率。Janos^[13]将 W14 培养基中的碳水化合物浓度从 10% 减到 9%,并使用液体形式的培养基,用 10% 的 Ficoll 代替琼脂,创建了 W14mf 培养基。周迪等^[14]比较了 4 种不同诱导培养基发现,W14mf 培养基诱导效果最好。W14mf 培养基已在小麦研究和育种计划中得到有效应用^[15],但由于基因型的影响,W14mf 培养基并不能适应于所有的小麦材料。

激素和碳源影响愈伤组织诱导的效果。2,4-D 作为最常用的生长素类激素,在诱导小麦花药愈伤组织形成中起关键作用,其最适浓度范围为 1.0~3.0 mg · L⁻¹^[16]。6-BA 等细胞分裂素类激素主要影响愈伤组织的增殖和分化,其与 2,4-D 的配比直接影响愈伤组织的质量^[17]。此外,ABA 在小麦花培中能够提高愈伤组织的抗逆性,并在胚胎发生过程中发挥重要作用,0.1 mg · L⁻¹ ABA 对小麦幼胚愈伤组织形成和分化最有利^[18]。阿拉伯半乳糖蛋白(AGP)在植物组织培养体系中通过调控细胞间信号传导和细胞壁动态

重塑,能够显著促进植物体细胞胚胎发生过程^[19]。虽然目前关于通过调节激素和碳源优化花培培养基的报道较多,但是研究结论却始终难以达成一致,不同研究中激素和碳源添加的最佳浓度及培养基的优化效率存在差异,因而此方面的研究仍需深入,特别是针对当前山东主栽小麦品种(系)的研究较为缺乏。本研究利用 W14mf 培养基对当前山东主栽小麦品种及具有高产潜力的小麦品系进行了愈伤诱导率筛选,同时以部分筛选出的中低愈伤诱导率的品种作为试验材料,以 W14mf 为基础培养基,通过调整 2,4-D、6-

BA、ABA 和 AGP 的添加浓度对培养基进行了优化,分析激素和碳源对小麦花培愈伤诱导率的影响,以期为提高小麦花培效率提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试小麦材料共 22 份(表 1),由山东省农业科学院作物研究所、中国科学院遗传与发育生物学研究所、石家庄农业科学院、烟台市农业科学研究院提供,种植于山东省农业科学院济南试验地。

表 1 供试材料
Table 1 Different types of test materials

序号 Serial number	材料 Material	育成单位 Breeding institution	来源 Source
1	济麦 19 Jimai 19	山东省农业科学院作物研究所 Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences	鲁麦 13/临汾 5064 Lumai 13/Linfen 5064
2	济麦 20 Jimai 20	山东省农业科学院作物研究所 Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences	鲁 884187/鲁麦 14 Lu 884187/Lumai 14
3	济麦 21 Jimai 21	山东省农业科学院作物研究所 Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences	865168/川农大 84-1109//冀 84-5418 865168/Chuannongda 84-1109//Ji 84-5418
4	济麦 22 Jimai 22	山东省农业科学院作物研究所 Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences	935024/935106
5	济麦 221001 Jimai 22101	山东省农业科学院作物研究所 Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences	16403/16wp191
6	济麦 26 Jimai 26	山东省农业科学院作物研究所 Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences	济麦 22/泰农 18 Jimai 22/Tainong 18
7	济麦 262 Jimai 262	山东省农业科学院作物研究所 Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences	临麦 2 号/烟农 19 Linmai 2/Yannong 19
8	济麦 35 Jimai 35	山东省农业科学院作物研究所 Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences	10 鉴 0435/冀师 02-1 10 Jian 0435/Jishi 02-1
9	济麦 37 Jimai 37	山东省农业科学院作物研究所 Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences	济麦 22/泰农 18 Jimai 22/Tainong 18
10	济麦 38 Jimai 38	山东省农业科学院作物研究所 Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences	ATHLET/藁城 9411 ATHLET/Gaocheng 9411
11	济麦 4072 Jimai 4072	山东省农业科学院作物研究所 Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences	洲元 9369/济麦 229 Zhouyuan 9364/Jimai 229
12	济麦 4075 Jimai 4075	山东省农业科学院作物研究所 Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences	山农 32/Ag073 Shannong 32/Ag073
13	济麦 44 Jimai 44	山东省农业科学院作物研究所 Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences	954072/济南 17 954072/Jinan 17
14	济麦 60 Jimai 60	山东省农业科学院作物研究所 Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences	济 037042/济麦 20 Ji 037042/Jimai 20
15	济麦 8040 Jimai 8040	山东省农业科学院作物研究所 Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences	泰农 18/RL6040//泰农 18 Tainong 18/L6040//Tainong 18
16	济南 17 Jinan 17	山东省农业科学院作物研究所 Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences	临汾 5064/鲁麦 13 号 Linfen 5064/Lumai 13
17	济糯 116 Jinuo 116	山东省农业科学院作物研究所 Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences	冀糯 200/郑麦 366 Jinuo 200/Zhengmai 366
18	科农 199 Kenong 199	中国科学院遗传与发育生物学研究所 Institute of Genetics and Developmental Biology, CAS	石 4185/科农 9204 Shi 4185/Kenong 9204
19	石 H083-336 Shi H083-366	石家庄农业科学院 Shijiazhuang Academy of Agricultural Sciences	石 03-4391/石 B03-5455 Shi 03-4319/Shi B03-5455
20	烟农 1212 Yannong 212	烟台市农业科学研究院 Yantai Academy of Agricultural Sciences	烟 5072/石 94-5300 Yan 5072/Shi 94-5300
21	烟农 24 Yannong 24	烟台市农业科学研究院 Yantai Academy of Agricultural Sciences	陕 229/安麦 1 号 Shaan 229/Anmai 1
22	烟农 999 Yannong 999	烟台市农业科学研究院 Yantai Academy of Agricultural Sciences	烟航选 2 号/临 9511//烟 BLU14-15 Yanhang Selection 2/Lin 9511//Yan BLU14-15

1.2 实验方法

1.2.1 接种方法和培养条件

选取田间生长的小麦植株,显微镜观察确认花粉发育处于单核靠边期(幼穗顶部位于旗叶叶耳的 1/3 至 2/3 位置)。从穗下节靠上部位剪下,插入装有水的烧杯中,在 4 ℃ 冰箱中春化处理 7 d。接种前剥出幼穗,用 75% 乙醇灭菌 30 s,超净工作台中无菌蒸馏水冲洗 3~4 次至无泡沫。用镊子取出约 50 个花药(2 穗)放入含有 15 mL W14mf 诱导培养基的培养皿中。封口膜将培养皿密封,置入 30 ℃ 培养箱暗培养 3 d,后转移到

28 ℃ 培养箱下继续暗培养 40~50 d。每份材料接种 4 皿,3 次重复。

1.2.2 高愈伤诱导率基因型的筛选

将选取的 22 份小麦材料利用 W14mf 诱导培养基^[20]进行培养,培养基的配置参照表 2,接种方法及培养条件与 1.2.1 相同。

1.2.3 不同外源添加物对愈伤诱导率的影响

选取愈伤诱导率中、低材料,在基础培养基 W14mf 中分别添加不同浓度的 2,4-D、6-BA、ABA 和 AGP(表 3),每个处理的每个材料接种 4 皿,3 次重复。培养条件同 1.2.1。

表 2 诱导培养基 W14mf
Table 2 Induction medium W14mf

成分 Component	药品名称 Name	浓度 Concentration/(mg · L ⁻¹)	成分 Component	药品名称 Name	浓度 Concentration/(mg · L ⁻¹)
大量元素 Makro	KNO ₃	2 000	微量元素 Mikro	MnSO ₄ · 4H ₂ O	8
	K ₂ SO ₄	700		ZnSO ₄ · 7H ₂ O	3
	NH ₄ H ₂ PO ₄	380		H ₃ BO ₃	3
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	140		KI	0.5
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	200		CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
铁-钠盐 Fe-Na EDTA	FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8		CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025
	Na ₂ EDTA	37.3		Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.005
维生素 Vitamin	Vitamin B1	2	其他 Other	Maltose	90 000
	Vitamin B6	0.05		2,4-D	2
	C ₆ H ₅ NO ₂	0.05		Kinetin	0.5
		Ficoll 400		100 000	

表 3 实验处理设计

Table 3 Experimental treatment design

序号 Serialnumber	添加物 Additives	浓度 Concentration/(mg · L ⁻¹)
1	2,4-D	1,1.5,2,2.5,3
2	6-BA	0,1,2,3,4
3	ABA	0,0.2,0.3,0.4
4	AGP	0,10,50,200,400

1.3 数据处理

愈伤诱导率 = 产生的愈伤组织块数/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 19.0 软件进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 小麦花药高愈伤诱导率基因型的筛选结果

通过 W14mf 诱导培养基对不同小麦基因型

花药进行培养,供试小麦材料的愈伤诱导率范围为 0~132%(表 4),且每种材料的愈伤诱导率变异系数均小于 30%。供试材料中,济麦 221001、烟农 1212、石麦 366、济麦 35 和烟农 999 的愈伤诱导率分别为 132%、87%、84%、81%和 76%,属于高愈伤诱导率材料;济麦 262、济麦 38、济麦 4072、科农 199、烟农 24 的愈伤诱导率在 10%~42%之间,为中愈伤诱导率的材料;其余 12 份材料为低愈伤诱导率材料,其愈伤诱导率小于 10%,其中济麦 19、济麦 26、济麦 22、济麦 37、济麦 60、济麦 8040 和济糯 116 愈伤诱导率均为 0。

2.2 2,4-D 浓度对小麦品种花培愈伤诱导率的影响

从中、低愈伤诱导率材料中选取济麦 262、济麦 38 和济糯 116,在 W14mf 诱导培养基中进行 2,4-D 浓度试验。结果显示,2,4-D 浓度对不同小麦基因型的愈伤诱导率影响有差异(表 5)。随 2,4-D 浓度的增加,济麦 262 愈伤诱导率先升后

表 4 22 个小麦基因型的花药愈伤诱导率
Table 4 Anther callus induction rates for the 22 wheat genotypes

材料 Material	愈伤诱导率 Induction rate of callus/%	材料 Material	愈伤诱导率 Induction rate of callus/%
济麦 19 Jimai 19	0	济麦 4075 Jimai 4075	1.5
济麦 20 Jimai 20	1.7	济麦 44 Jimai 44	6.0
济麦 21 Jimai 21	0.9	济麦 60 Jimai 60	0
济麦 22 Jimai 22	0	济麦 8040 Jimai 8040	0
济麦 221001 Jimai 22101	132.0	济南 17 Jinan 17	3.5
济麦 26 Jimai 26	0	济糯 116 Jinuo 116	0
济麦 262 Jimai 262	34.5	科农 199 Kenong 199	42.0
济麦 35 Jimai 35	81.0	石麦 366 Shimai 366	84.0
济麦 37 Jimai 37	0	烟农 1212 Yannong 212	87.0
济麦 38 Jimai 38	10.0	烟农 24 Yannong 24	15.0
济麦 4072 Jimai 4072	31.5	烟农 999 Yannong 999	76.0

表 5 不同 2,4-D 处理下小麦花药愈伤诱导率差异
Table 5 Difference of callus induction rate of wheat anthers under different 2,4-D treatments

基因型 Genotype	浓度 Concentration/ (mg · L ⁻¹)	愈伤诱导率 Induction rate of callus/%
济麦 262 Jimai 262	1.0	0d
	1.5	26.0b
	2.0(CK)	34.5a
	2.5	28.5b
	3.0	8.0c
济麦 38 Jimai 38	1.0	21.0a
	1.5	2.5d
	2.0(CK)	10.0c
	2.5	0.5d
	3.0	16.0b
济糯 116 Jinuo 116	1.0	0
	1.5	1.0
	2.0(CK)	0
	2.5	0
	3.0	0

愈伤诱导率数值后的小写字母表示不同浓度间在 0.05 水平上差异显著性。下表同。

Lowercase letters after the callus induction rate values indicate significant differences among different concentration levels at 0.05 level. The same in tables 6-8.

降,2,4-D 浓度为 2.0 mg · L⁻¹ 时愈伤诱导率最高;济麦 38 愈伤诱导率对 2,4-D 浓度反应缺乏规律性,但以 1.0 mg · L⁻¹ 2,4-D 浓度的愈伤诱导率最高;2,4-D 浓度对济糯 116 愈伤诱导率无明显影响,愈伤诱导率最高仅为 1%,此时培养基中 2,4-D 浓度为 1.5 mg · L⁻¹。

2.3 6-BA 浓度对小麦品种花培愈伤诱导率的影响

在 W14mf 诱导培养基中添加不同浓度的 6-BA,并观察 3 个不同小麦基因型愈伤诱导率的变化。结果表明,不同基因型的愈伤诱导率对 6-BA 浓度反应不同(表 6)。随 6-BA 浓度的增加,济麦 262 和济糯 116 愈伤诱导率均呈先升后降趋势,分别以 1.0 和 2.0 mg · L⁻¹ 的 6-BA 处理最高;6-BA 浓度对济麦 38 愈伤诱导率影响的规律性不强,最高愈伤诱导率的浓度为 0 mg · L⁻¹,且与其他浓度差异显著,说明添加 6-BA 对济麦 38 的愈伤组织诱导有抑制作用。

表 6 不同 6-BA 处理下小麦花药愈伤诱导率差异
Table 6 Difference of callus induction rate of wheat anthers under different 6-BA treatments

基因型 Genotype	浓度 Concentration/ (mg · L ⁻¹)	愈伤诱导率 Induction rate of callus/%
济麦 262 Jimai 262	0 (CK)	34.5b
	1.0	75.0a
	2.0	10.0c
	3.0	9.0cd
	4.0	3.5d
济麦 38 Jimai 38	0(CK)	10.0a
	1.0	3.5c
	2.0	1.0d
	3.0	7.5b
	4.0	3.0cd
济糯 116 Jinuo 116	0(CK)	0b
	1.0	0.5b
	2.0	10.0a
	3.0	0.5b
	4.0	1.5b

2.4 ABA 浓度对小麦品种花培愈伤诱导率的影响

以济麦 4072、济南 17 和济糯 116 为材料,在 W14mf 诱导培养基中添加不同浓度的 ABA。结果发现,不同基因型的愈伤诱导率受 ABA 浓度影响不同(表 7)。随 ABA 浓度的提高,济麦 4072 的愈伤诱导率呈先升后降趋势,济南 17 的愈伤诱导率呈下降趋势,两个品种的愈伤诱导率分别以 0.2 和 0 mg · L⁻¹ ABA 处理最高,且与其他处理差异显著,说明添加 ABA 可促进济麦 4072 愈伤组织形成,但对济南 17 的愈伤组织形成有抑制作用;添加 ABA 对济糯 116 愈伤组织形成没有影响。

表 7 不同 ABA 处理下小麦花药愈伤诱导率的差异

Table 7 Difference of callus induction rate of wheat anthers under different ABA treatments

基因型 Genotype	浓度 Concentration/ (mg · L ⁻¹)	愈伤诱导率 Induction rate of callus/%
济麦 4072 Jimai 4072	0 (CK)	31.5b
	0.2	36.0a
	0.3	15.5c
	0.4	5.0d
济南 17 Jinan 17	0 (CK)	3.5a
	0.2	1.0b
	0.3	0.5b
	0.4	0.5b
济糯 116 Jinuo 116	0 (CK)	0
	0.2	0
	0.3	0
	0.4	0

2.5 AGP 浓度对中低愈伤诱导率小麦品种花培愈伤诱导率的影响

在 W14mf 诱导培养基中添加不同浓度的 AGP 后,不同基因型的愈伤诱导率反应不同(表 8)。三个基因型均在 AGP 浓度达到 400.0 mg · L⁻¹ 时最高。其中,在此浓度下,济麦 38 的愈伤诱导率达到 24.5%,较 CK 提高了 1.5 倍;济麦 4075 的愈伤诱导率达到 13.5%,较 CK 提高了 8.0 倍;济麦 22 的愈伤诱导率达到 4.5%,且其他浓度下均未产生愈伤组织。为了进一步印证此结果,又选取了济麦 262、济麦 4072、科农 199 和烟农 24 四份中等愈伤诱导率材料进行实验,在添加 400.0 mg · L⁻¹ 的 AGP 后的愈伤诱导率分别提高到 62.1%、68.5%、59.8% 和 71.2%,说明添加 AGP 有利于小麦形成愈伤组织。

表 8 不同 AGP 处理下小麦花药愈伤诱导率的差异

Table 8 Difference of callus induction rate of wheat anthers under different AGP treatments

基因型 Genotype	浓度 Concentration/ (mg · L ⁻¹)	愈伤诱导率 Induction rate of callus/%
济麦 38 Jimai 38	0(CK)	10.0bc
	10.0	12.0ab
	50.0	7.5c
	200.0	7.0c
	400.0	24.5a
济麦 4075 Jimai 4075	0(CK)	1.5b
	10.0	0.5b
	50.0	1.5b
	200.0	0.5b
	400.0	13.5a
济麦 22 Jimai 22	0(CK)	0
	10.0	0
	50.0	0
	200.0	0
	400.0	4.5

3 讨论

3.1 激素对小麦花药愈伤诱导率的影响

在小麦花培中,生长素类和细胞分裂素类植物激素发挥着关键作用。其中,生长素类激素包括 NAA、IAA、2,4-D 等,细胞分裂素类激素包括 KT、6-BA、ZT 等。这两类激素在培养过程中相辅相成,共同推动花药的愈伤组织形成和植株再生^[21]。通过调整这两类激素的混合比例,可以有效地控制花粉细胞的脱分化和再分化过程,进而提高愈伤诱导率和植株的再生率。研究发现,2,4-D 在诱导培养基中的适宜浓度为 0.5~2.0 mg · L⁻¹^[22]。2,4-D 浓度超过 2.0 mg · L⁻¹ 时胚胎结构再生成植株的能力会丧失^[23]。生长素在浓度低于 0.5 mg · L⁻¹ 后不会刺激胚胎结构的诱导^[24]。本研究在 W14mf 诱导培养基基础上,分别改变 2,4-D 和 6-BA 浓度,发现济麦 262 的愈伤诱导率在 1.0 mg · L⁻¹ 的 6-BA 处理下最高,当 6-BA 的浓度继续上升时,愈伤组织的数量却有所下降。这与赵占军等^[25]的研究结果相一致。李文卓等^[26]的实验结果显示,在基本培养基 C17 中添加 6-BA 和 2,4-D 可以获得愈伤组织的高诱导率,且 2,4-D 与 6-BA 以 2:1 的体积比得到的结果与本研究中济麦 262 相符。然而本研究中,添加 6-BA 对济麦 38 的愈伤诱导有抑制作用。

这说明 2,4-D 与 6-BA 的添加浓度受基因型影响较大,因此选择最适的激素浓度应根据材料而定。

已有研究表明,小麦花培体系中,以幼胚作为外植体时,2.0 mg · L⁻¹ 2,4-D 与 0.3 mg · L⁻¹ ABA 的激素组合可有效抑制幼胚直接萌发现象,同时显著提升胚性愈伤诱导率和植株再生率^[27]。本研究中,在含有 2.0 mg · L⁻¹ 2,4-D 的 W14mf 培养基中加入 0.2 mg · L⁻¹ ABA 后,济麦 4072 的花药愈伤诱导率达到 36%,但济糯 116 的愈伤组织未能被诱导出。这表明同一培养基并不适用于所有小麦基因型。

3.2 碳源对小麦花药愈伤诱导率的影响

在诱导培养基的改进中,重要的是确定在小孢子分裂、多细胞结构发展和减少应激诱导细胞死亡中起作用的新化学物质^[28-29]。Letarte 等^[30]研究发现,阿拉伯半乳糖和阿拉伯半乳糖蛋白在诱导小麦体外雄激素发生方面有积极作用。外源阿拉伯半乳糖蛋白对小孢子衍生胚状体的第一次细胞分裂和发育有积极影响^[31-32]。

济麦 22 是山东省农业科学院选育的高产、广适小麦品种,播种面积连续 9 年蝉联中国第一。以其为亲本,育种家们已培育出了 140 多个小麦新品种(系)。尽管济麦 22 具有高产、稳产、广适等优点,但其愈伤诱导率较低^[33],限制了其在组织培养技术中的应用。针对这一问题。本研究探索了通过添加不同浓度的 AGP 来提高小麦愈伤诱导率的可能性。结果表明,当 AGP 的添加浓度为 400 mg · L⁻¹ 时,将济麦 22 的愈伤诱导率从 0 提升至 4.5%。另外,对于济麦 38 和济麦 4075,当 AGP 的添加浓度为 400 mg · L⁻¹ 时,愈伤诱导率均有所提高。进一步选取在 W14mf 培养基中表现为中愈伤诱导率的 4 份材料进行验证,在添加 400 mg · L⁻¹ AGP 后,这些材料的愈伤诱导率均达到 50% 以上,实现高愈伤诱导,这可能是因为该 AGP 浓度适宜花药与子房共培养,从而促进雄性核的发育和愈伤组织的形成。这与王伟等^[34]的研究结果相一致。综上所述,AGP 的添加为提高济麦 22 小麦品种的愈伤诱导率提供了一种有效的策略,这不仅有助于拓宽济麦 22 在小麦育种中的应用范围,也为其他低诱导率小麦品种的花培提供了新的思路。

参考文献:

- [1] 杨延铭,王娜.植物单倍体诱导的方法、应用及展望[J].自然杂志,2024,46(4):285.
- [2] ALAM M, BAENZIGER P S, FRELS K. Emerging trends in wheat (*Triticum* spp.) breeding: Implications for the future [J]. *Frontiers in Bioscience*, 2024, 16(1): 2.
- [3] DWIVEDI S L, BRITT A B, TRIPATHI L, *et al.* Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding [J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(6): 812.
- [4] 杨宝全,李奎亮.国审小麦花培 5 号特点及栽培技术[J].种业导刊,2008(8):24.
- YANG B Q, LI K L. Characteristics and cultivation techniques of national trial wheat Huapei 5 [J]. *Seed Industry Guide*, 2008(8): 24.
- [5] 马巧云,单福华,田立平,等.国审小麦新品种京花 11 号的优良特性分析[J].农业科学,2018(9):1108.
- MA Q Y, SHAN F H, TIAN L P, *et al.* Analysis on the excellent characteristics of the national authorized wheat variety Jinghua 11 [J]. *Hans Journal of Agricultural Sciences*, 2018(9): 1108.
- [6] 王成社,李景琦,邹淑芳,等.小麦新品种陕农 28 的选育与花培育种技术的改良[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2002,30(4):21.
- WANG C S, LI J Q, ZOU S F, *et al.* Discussion on the improvement of haploid breeding from selecting new varieties of Shaannong 28 [J]. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry*, 2002, 30(4): 21.
- [7] 王伟,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.
- [8] ORŁOWSKA R, PACHOTA K A, MACHCZYŃSKA J, *et al.* Improvement of anther cultures conditions using the Taguchi method in three cereal crops [J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2020, 43: 8.
- [9] 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.
- [10] KARIMZADEH G, KOVÁCS G, BARNABÁS B. Effects of cold treatment and different culture media on the androgenic capacity of two winter wheat genotypes [J]. *Cereal Research Communications*, 1995, 23(3): 223.
- [11] OUYANG J W, JIA S E, ZHANG C, *et al.* A new synthetic medium (W14) for wheat anther culture [J]. *Annual report*, 1989, 9192.
- [12] BARNABÁS B. Protocol for producing doubled haploid plants from anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) [M]//Doubled Haploid Production in Crop Plants. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003: 65.

- [13] JÁNOS P. Androgenesis és a genetikai transzformáció különböző gabonafajokban [D]. Budapest: Hungarian Academy of Sciences, 2003:1-3.
- [14] 周迪, 孙连发, 陈立君. 不同诱导培养基对小麦花药培养胚状体诱导率的影响[J]. 黑龙江农业科学, 2012(6):9.
ZHOU D, SUN L F, CHEN L J. Effect of different media on the induction rate of embryoid in wheat anther culture [J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2012(6):9.
- [15] LANTOS C, PAUK J. Anther culture as an effective tool in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding [J]. *Russian Journal of Genetics*, 2016, 52:794.
- [16] 陈学虎, 陈耀锋, 王丽, 等. 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[J]. 麦类作物学报, 2013, 33(3):450.
CHEN X H, CHEN Y F, WANG L, et al. Study on the effects of genotypes and 2,4-D concentration on *in vitro* culture traits of explants [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2013, 33(3):450.
- [17] 贾礼聪, 王连军, 杨子桐, 等. 不同 IAA 和 6-BA 质量浓度组合对甘薯茎尖培养和表型变异的影响[J]. 河南农业科学, 2023, 52(12):42.
JIA L C, WANG L J, YANG Z T, et al. Effect of combinations with different concentrations of IAA and 6-BA on shoot tip culture and phenotypic variation of sweet potato [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2023, 52(12):42.
- [18] 何盛莲. ABA 在小麦幼胚培养中的应用研究[J]. 安徽农业科学, 2023, 51(6):18.
HE S L. Application of ABA in immature embryo culture of wheat [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2023, 51(6):18.
- [19] TESTILLANO P S. Microspore embryogenesis: Targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(11):2965.
- [20] KANBAR O, LANTOS C, PAUK J. *In vitro* anther culture as efficiently applied technique for doubled haploid production of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Ratarstvoi Povrtarstvo*, 2021, 58(1):31.
- [21] LANTOS C, PAUK J. Factors influencing the efficiency of wheat anther culture [J]. *Acta Biologica Cracoviensia*, 2021, 62(2):7.
- [22] WEIGT D, NIEMANN J, SIATKOWSKI I, et al. Effect of Zearalenone and hormone regulators on microspore embryogenesis in anther culture of wheat [J]. *Plants*, 2019, 8(11):487.
- [23] ZHENG M Y, KONZAK C F. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction and plant regeneration in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant Cell Reports*, 1999, 19(1):69.
- [24] GORBUNOVA V Y, KRUGLOVA N N, ABRAMOV S N. The induction of androgenesis *in vitro* in spring soft wheat. balance of exogenous and endogenous phytohormones [J]. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 2001, 28(1):25.
- [25] 赵占军, 陈茂盛, 王贵娟. 胚龄和激素对小麦幼胚组织培养的影响[J]. 生物技术, 2003, 13(5):7.
ZHAO Z J, CHEN M S, WANG G J. Effect of age of immature embryos and exogenous hormones on the tissue culture from immature embryos of wheat [J]. *Biotechnology*, 2003, 13(5):7.
- [26] 李文卓, 郝峥嵘, 崔建平, 等. 激素对小麦和小黑麦杂交后代花药培养和染色体加倍的影响[J]. 复旦学报(自然科学版), 1998, 37(4):573.
LI W Z, HAO Z R, CUI J P, et al. The effect of hormone on anther culture and chromosome doubling of *Triticum* × *Triticale* hybrid progeny [J]. *Journal of Fudan University*, 1998, 37(4):573.
- [27] 别晓敏, 杜丽璞, 余茂云, 等. 不同生长素类型及 ABA 搭配对小麦幼胚再生效果的影响[J]. 核农学报, 2011, 25(5):1023.
BIE X M, DU L P, SHE M Y, et al. Effects of different auxins and combining application with ABA on regeneration of immature embryos of wheat [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2011, 25(5):1023.
- [28] TESTILLANO P S. Microspore embryogenesis: Targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(11):2965.
- [29] NIAZIAN M, SHARIATPANAH M E. *In vitro*-based doubled haploid production: Recent improvements [J]. *Euphytica*, 2020, 216(5):69.
- [30] LETARTE J, SIMION E, MAI M E, et al. Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture [J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 24(12):691.
- [31] BROUGHTON S. Ovary co-culture improves embryo and green plant production in anther culture of Australian spring wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2008, 95(2):185.
- [32] TESTILLANO P S. Microspore embryogenesis: Targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(11):2965.
- [33] 赵林妹, 刘录祥, 古佳玉, 等. 冬小麦高花药培养力基因型的筛选[J]. 麦类作物学报, 2017, 37(10):1294.
ZHAO L S, LIU L X, GU J Y, et al. Screening of winter wheat germplasms with high anther culture ability [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2017, 37(10):1294.
- [34] 王炜, 杨随庄. CoCl₂ 和 AGP 对小麦花药愈伤组织诱导的影响[J]. 甘肃农业科技, 2010, 41(12):10.
WANG W, YANG S Z. Effects of CoCl₂ and AGP on the induction of wheat anther callus [J]. *Gansu Agricultural Science and Technology*, 2010, 41(12):10.