# 小麦花药漂浮培养技术

刘宁涛[1] 赵远玲[2] 车京玉[1] 张起昌[1] 田 超[1] 尹雪巍[1] 代丽婷[1] 邵立刚[1]
（[1]黑龙江省农业科学院克山分院，齐齐哈尔 161005，[2]黑龙江省农业科学院作物资源研究所，哈尔滨 150081）

**摘要：**小麦花药培养是单倍体育种中快速稳定育种材料的主要途径之一。对实验室小麦花药培养过程中运用的高效愈伤组织漂浮诱导培养基W14-F、再生培养基190-2Cu、花药培养操作方法及加倍技术等方面进行梳理，旨在为国内小麦花药培养研究和育种者提供一些参考。

**关键词：**小麦；花药；漂浮培养

## Wheat Anther Floating Culture Technique

LIU Ning-tao[1], ZHAO Yuan-ling[2], CHE Jing-yu[1], ZHANG Qi-chang[1],
TIAN Chao[1], YIN Xue-wei[1], DAI Li-ting[1], SHAO Li-gang[1]
([1]*Keshan Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Qiqihaer 161005*;
[2]*Crop Recourse Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Harbin 150086*)

小麦花药培养是一项快速、有效稳定育种材料的技术，具有稳定杂种性状、缩短育种年限、选择效率高等优点[1-2]，也是产生单倍体材料的主要方法之一。围绕小麦花药培养过程中供体材料的基因型、培养基、愈伤组织诱导、绿苗分化及染色体加倍技术中效率低的问题，科学家们开展了大量的研究使得小麦花药培养效率得到一定的提高，同时也相继育成了京花1号、Florida、花培5号、花培28号、豫麦37、宁春50等小麦品种应用于生产[3-5]。然而供体材料的基因型仍然是影响花药培养的主要因素[6-8]，在配制杂交组合的过程中需选择培养能力强的材料作为亲本，以减少花培对基因型的依赖，提

**基金项目：**国家外国专家项目（G2022011001）；黑龙江省属科研业务费项目（CZKYF2021B005）；国家小麦产业技术体系（CARS-03）；黑龙江省小麦协同创新推广体系

**通信作者：**邵立刚

同时《阿坝州种业振兴行动方案》在前期调研的基础上，从农作物、畜禽（阿坝中蜂）、果蔬、水产等4个方面发力，在3年内集中实施一批种业相关项目，打好“种业翻身仗”。

种业是农业的“芯片”，是建设现代农业的标志性、先导性工程，也是国家战略性、基础性产业[3]。种业振兴作为国家战略具有重要意义，既是保障国家粮食安全的重要举措，也是维护国家生态安全的重要保障。目前阿坝州正在积极构建长江、黄河上游重要生态屏障，坚持走生态优先、绿色发展之路。虽然阿坝州在农业种质资源保护方面还存在差距，但在州委、州政府的坚强领导下，通过实施一批有代表性的种业基础工程项目，打好种业振兴“组合拳”，将极大地促进阿坝州种质资源保护与利用工作，为打好“种业翻身仗”贡献阿坝力量。

**参考文献**

[1] 马改艳，徐学荣. 实施种业振兴行动的重大意义、主要问题与突破路径. 江苏农业科学，2022，50（18）：1-9

[2] 阿坝州人民政府. 关于印发《阿坝藏族羌族自治州“十四五”农业农村经济发展规划（2021-2025）年》的通知.（2022-05-24）[2022-11-30]. http：//www. abazhou. gov. cn/abazhou/c102077/202206/f102641f102073c81644066b81644008d81644063ff81644029f81644061e81648754. shtml

[3] 王术坤，韩磊. 中国种业发展形势与国际比较. 农业现代化研究，2022，43（5）：814-822

（收稿日期：2022-11-30）

高培养效率，除此之外培养基、激素配比、培养条件、碳源等也是影响花药培养的关键因素。最新研究成果表明麦芽糖作为碳源能够形成胚状体并进一步再生植株，且能够有效减少白化苗的再生[9]。在花药培养方式方面的研究也表明浸润式培养、液体培养方式[10]能够得到更多的愈伤组织和绿苗，说明利用液体培养能够有效地提高小麦花药培养效率。周迪等[11]引进匈牙利小麦液体诱导培养基W14-F，对人工合成小麦和普通小麦$F_1$花药培养愈伤组织诱导研究，发现该培养基在愈伤组织诱导率方面明显高于国内普遍应用的C17、N6和1/2 MS培养基。

本实验室采用匈牙利小麦育种家Pauk Janos花药漂浮培养技术[12]，并在其基础上简化了生根培养、优化了预处理等环节，愈伤组织产出明显提高，同时2021年加倍率达到了64.6%，大幅度提高了小麦花药培养的效率。为了更好地促进我国小麦花药培养育种技术，对实验室运用的小麦花药漂浮培养技术进行梳理，期望能够为国内利用小麦花药培养技术开展单倍体选择的育种者们提供参考。

## 1 花药培养基配制

小麦花药愈伤组织诱导培养基为W14-F，再生培养基为190-2Cu，具体配方见表1。

W14-F诱导漂浮培养基配制完成后分装于培养皿中，每皿分装液体培养基12mL，用封口膜封口后灭菌，备用。190-2Cu分化培养基为固体培养基，分装于直径为9cm的培养皿中，每个培养皿中10mL培养基，灭菌备用。培养基pH值为5.8。

## 2 花药培养步骤[14]

**2.1 外植体选择与预处理** 外植体选择 选择$F_2$重点组合作为外植体进行花药培养。外植体取材与预处理 取大田种植的健壮植株，用显微镜进行镜检，选择小孢子发育正处于单核靠边期的幼穗最佳；形态学上一般表现为幼穗顶部处于旗叶与旗叶叶耳1/3~2/3处的植株，用剪刀沿着茎部斜口剪断，每个组合取20~30穗，并用橡皮筋捆成一捆，写好标签，后放入装有自来水的小桶中，尽快带回实验室。用塑料密封袋密封后置于4℃冰箱内低温处理3d。外植体灭菌 接种之前将幼穗剥出后放入血清瓶中，加入一定量的消毒液（次氯酸钠和无菌水比例为1∶1），并加入2滴土温80，水平方向放至摇床上震荡20min。血清瓶用75%的乙醇擦拭消毒后放入超净工作台中，倒出消毒液，后用无菌水冲洗幼穗3~4次，直到瓶内不再产生泡沫为止。

表1 小麦花药诱导、分化、生根培养基配方

| 类型 | 药品成分 | 浓度（mg/L） | |
|---|---|---|---|
| | | W14-F[13] | 190-2Cu[12] |
| 大量元素 | $KNO_3$ | 2000 | 1000 |
| | $NH_4H_2PO_4$ | 380 | - |
| | KCl | - | 40 |
| | $(NH_4)_2SO_4$ | - | 200 |
| | $KH_2PO_4$ | - | 300 |
| | $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 14 | - |
| | $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ | - | 100 |
| | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 200 | 200 |
| | $K_2SO_4$ | 700 | - |
| 微量元素 | $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ | 8 | 0.5 |
| | $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 3 | 3 |
| | $H_3BO_3$ | 3 | 8 |
| | KI | 0.05 | 0.5 |
| | $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0.025 | 0.5 |
| | $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0.025 | - |
| | $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 0.005 | - |
| 维生素 | 烟酸 | 0.5 | 0.5 |
| | 维生素$B_6$ | 0.5 | 0.5 |
| | 维生素$B_1$ | 2 | 1 |
| | 肌醇 | - | 100 |
| 铁-钠盐 | $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 27.8 | 27.8 |
| | $Na_2EDTA$ | 37.3 | 37.3 |
| 其他 | 甘氨酸 | - | 2 |
| | 2,4-D | 2 | - |
| | KT | 0.5 | 0.5 |
| | NAA | - | 0.5 |
| | 麦芽糖 | 80000 | 30000 |
| | Gelrite | - | 2800 |
| | Ficoll | 100000 | - |

**2.2 诱导方法** 接花药 手部用75%乙醇消毒晾干后取已高压灭菌的小镊子一把，蘸取75%的乙醇再用酒精灯外焰烤火灭菌，之后放旁边冷却备用。接

花药时用左手夹住已灭菌的幼穗，用小镊子去掉颖壳剥出花药，放置于培养基上。愈伤组织诱导培养

将取出的小麦花药放入装有诱导培养基的培养皿中（直径9cm），每个培养皿中约300个花药，接种完成后需用封口膜及时密封。把密封好的培养皿放入恒温培养箱中，在32℃下暗培养3d，再转入28℃培养箱中暗培养50~60d。愈伤组织分化培养　当愈伤组织形成后，直径1~2mm时，及时在无菌环境下将愈伤组织转移到分化培养基，培养箱条件为25±1℃、16h光照培养，光强2000~3000Lx，8h暗培养，30d左右会出现绿苗。

**2.3　花药培养加倍技术**　绿苗出现2~3片绿叶时，转入盆栽，待新根生长健壮后移到温室内炼苗3~4d，后移栽到花盆中。

**2.3.1　化学药剂加倍法**　分蘖期将单倍体绿苗根部用自来水冲洗干净，剪去根尖留约2cm左右，根部浸入含有0.2%秋水仙碱+2%DMSO（二甲基亚砜）的溶液中5h，随后用自来水冲洗过夜、移栽，保持高湿环境下16h光照，白天温度18℃，晚上15℃，约2周出现新分蘖后正常管理。

**2.3.2　自然加倍法**　绿苗出现分蘖时给予适当的低温胁迫约6周，弱光条件下能够实现部分植株自然加倍。

## 3　花药培养技术注意事项

（1）在选择花药培养组合时，其亲本之一应具有强培养力且一般配合力高，以减少花培材料对基因型的依赖，进而提高花药培养的效率。（2）多数情况下研究者们选择$F_1$组合材料进行花药培养。匈牙利小麦花药培养过程中在$F_1$对主要流行性病害等不利性状进行一次淘汰，选择$F_2$植株进行花药培养，这样获得的植株更加接近育种目标，这一点值得我们借鉴。（3）花药培养过程中的污染问题。在进行花药培养之前需要对培养室环境进行彻底消毒，同时要重视对外植体材料和器皿的消毒，也可以在诱导培养基中适当加入一些抗生素，降低花药培养过程中污染率。另外，匈牙利的漂浮诱导培养基中加入了Ficoll（一种聚蔗糖），对于污染有一定的抑制作用，其作用有待于进一步研究。（4）外植体预处理时要注意密封性，并保持一定的湿度，防止外植体材料水分散失；恒温培养箱培养期间也需保持一定湿度；绿苗移栽中也一定要保持湿度，提高幼苗的成活率。（5）经诱导形成的愈伤组织直径达到1~2mm时及时转入分化培养基中进行再培养，直径超过2mm，其再生能力会有所下降。（6）花药培养过程中尽量多接种花药，构建大量的基础群体，以便于能够获得较多的理想植株。

**参考文献**


[1] 刘宁涛. 小麦花药培养效率改进和基因型筛选研究. 北京：中国农业科学院，2013

[2] 周迪. 不同培养基对合成小麦和普通小麦花药培养效率的影响. 哈尔滨：哈尔滨师范大学，2012

[3] 马强，余国东，李伯群，任正隆，周凤云，李泽碧，廖敦秀. 小麦单倍体诱导技术研究进展. 南方农业，2010（11）：72-76

[4] 魏亦勤，叶兴国，李红霞，刘旺清，张双喜，裘敏，樊明，方亮. 回交改良和花药培养在宁春50号小麦新品种选育中的应用. 种子，2013（3）：123-125

[5] 康明辉，海燕，达龙珠，周新宝. 国审小麦新品种“花培5号”的选育及其特征特性. 中国农学通报，2009，25（17）：98-101

[6] 董艳辉，赵兴华，李亚莉，王亦学，任永康，王长彪，唐朝晖. 小麦花药培养各种影响因子的研究进展. 山西农业科学，2018，46（1）：135-137，140

[7] 孙志玲，杨雪峰，宋维富，赵丽娟，刘东军，宋庆杰，张春利，辛文利. 基因型对春小麦花药培养力的影响. 黑龙江农业科学，2019（12）：1-5

[8] 韩晓峰，陶丽莉，殷桂香，刘晓蕾，杜丽璞，魏亦勤，晏月明，叶兴国. 基因型和环境条件对小麦花药培养效果的影响. 作物学报，2010，36（7）：1209-1215

[9] 李慧，赵林姝，古佳玉，郭会君，谢永盾，熊宏春，赵世荣，丁玉萍，徐延浩，刘录祥. 小麦花药培养体系优化及高再生力基因型的筛选. 植物遗传资源学报，2022，23（3）：738-745

[10] 赵林姝，何子伟，刘丽，古佳玉，谢永盾，郭会君，赵世荣，李军辉，熊宏春，丁玉萍，刘录祥. 小麦花药液体漂浮离体培养体系的建立与应用. 麦类作物学报，2018，38（1）：22-27

[11] 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. 黑龙江农业科学，2012（6）：9-12

[12] Pauk J，Mihaly R，Puolimatka M. Protocol of wheat（*Triticum aestivum* L.）anther culture in doubled haploid production in crop plants. Dordrecht，The Netherlands：Kluwer Academic Publishers，2003

[13] Csaba L，Pauk J. Anther culture as an effective tool in winter wheat（*Triticum aestivum* L.）breeding. Russian Journal of Genetics，2016，52，794-801

[14] Csaba L，Szandra P，Katalin A，Bernadett L，Lajos B，Krisztina B，Ferenc B，Pauk J. Utilization of in vitro anther culture in spelt wheat breeding. Plants，2019，8（10）：436


（收稿日期：2022-11-30）