

分类号_____

密 级_____

UDC_____

单位代码 10733

甘肃农业大学

硕士学位论文

小黑麦的花药培养和胚培养技术研究

Studies on the anther culture and embryo rescue technology of
tritcale

李雪

指导教师姓名 杜文华 教授 (甘肃农业大学 兰州 730070)

学科专业名称 草地生物多样性 研 究 方 向 草地植物多样性保护与利用

论文答辩日期 2017 年 5 月 14 日 学位授予日期 2017 年 6 月

答辩委员会主席 王锁民 教授

评 阅 人 宛涛 教授

黄琳凯 教授

2017 年 6 月

项目来源

国家自然科学基金项目（31360577）

国家公益性行业（农业）科研专项（201003019）

教育部博士点科学基金（20136202110005）

摘要

小黑麦 (*Triticale wittmack*) 兼具小麦的丰产性和籽粒的优良品质, 以及黑麦抗逆性强和适应性广等特点, 是一种很有前途的粮饲兼用型作物。

我国小黑麦新品种的培育大多采用常规育种技术, 其缺点是育种年限长、杂交后代变异范围广、工作量大, 同时也不能满足畜牧业快速发展对草品种的需求。如果在常规育种基础上, 引进和运用现代育种技术, 就可以使品种选育向快速、高效、定向的方向发展。以花药培养技术为基础的单倍体育种, 经染色体加倍, 形成遗传背景完全同质的二倍体植株, 为双单倍体 (DH) 植株。由于 DH 植株基因型纯合, 无需多代自交纯合, 可加快育种进程, 在较短时间内培育出新品种, 达到品种改良的目的。为完善小黑麦花药培养技术体系, 为小黑麦单倍体育种奠定基础。本论文在项目组前期研究基础上, 研究了低温 (4°C) 预处理时间 (15 d, 20 d, 25 d, 30 d, 35 d, 40 d) 和高温 (32°C) 培养时间 (0 d, 1 d, 2 d, 3 d) 对小黑麦花药培养的影响, 以及小黑麦不同基因型 (石大1号小黑麦品种, 甘农1号小黑麦品种, 小黑麦品系 P4, TZ3, TZ10, TZ12, TZ23, TZ25, TZ26) 的花药培养效果。通过2年研究得到以下结果: 幼穗低温预处理25 d 时, 花药的出愈率最高; 花药高温培养2 d 时, 石大1号出愈率 (56%) 最高, 而P4不进行预处理时最高; 小黑麦基因型间花药出愈率及绿苗分化率有显著差异, TZ26、TZ25 和P4的出愈率及绿苗分化率显著高于其余材料, 石大1号的出愈率较高, 但绿苗分化率低。

牧草饲料作物种子如果在常温下存放时间太长, 种子会发生劣化, 使种子发芽力降低或丧失发芽能力。为获得劣化小黑麦品种种子的再生苗, 对种质资源进行挽救。本研究将从澳大利亚引进的 10 个小黑麦品种的劣化种子的胚在 1/2MS+2%蔗糖+0.1%麦芽糖+0.5%琼脂、pH 5.8 的培养基中进行培养。结果表明: 劣化小黑麦品种种子胚的发育率和成苗率由高到低分别为: DH265 > Cherokee > 2090White > AT528 > WhileM96-3182-1 > AT754 > AT315 和 Cherokee > DH265 > 2090White > AT528 > WhileM96-3182-1 > AT754 > AT315, 上述材料的胚发育率和成苗率均显著低于正常小黑麦材料 (CK1, CK2); 小黑麦品种 33rd ITSN、32rd ITSN 和 Rhino 的胚发育率和成苗率均为 0; 劣化小黑麦种子进行胚培养时, 诱

导培养的适宜时间为 27 d。

关键词：小黑麦；花药培养；温度；基因型；种子；劣化；胚培养

Summary

Triticale wittmack, it owns the advantage of wheat such as high seed yield and quality and rye such as strong stress-tolerance and good adaptability. It is a crop could be used as grain and forage and has wonderful future.

Traditional breeding technique is widely used in triticale breeding in China. The disadvantages of traditional breeding are the long period to breed a new variety, wide variation of offspring, heavy workload, blindly selection and so on. In one word, traditional breeding could not meet the need that the rapid development of animal husbandry on forage varieties. If the traditional breeding method were combined with modern breeding techniques, forage breeding would be much more rapid, efficient and objective. Haploid breeding which is based on the anther culture and does not need to self-bred could shorten the time to breed a new variety. In order to improve the anther culture techniques of triticale, this thesis studied the effects of different periods of high- and low- temperature treatment on the anther culture of triticale and the efficiency of anther culture for different triticale genotypes. After 2 years' study, main results were as follows, a) Highest callus induction rate was obtained after the anther was treated for 25 days (17.27%) under the temperature of 4°C; b) Highest callus induction rate for the triticale variety Shida No. 1 (56%) was got while the anther was treated for 2 days under the temperature of 32°C, but for P4, the callus induction rate reduced after the high temperature treatment; c) The callus induction rate and seedling rate were various for different triticale genotypes. The callus induction rate and seedling rate of TZ26, TZ25 and P4 were significantly higher than that of the other genotypes. Although the callus induction rate of Shida No. 1 was high, the seedling rate was low.

Seeds of forage crop will deteriorate and the germination will reduce or lost if they are stored at the room temperature for a long time. In order to obtain the regeneration seedlings of these triticale varieties with deteriorated seeds and rescue these germplasm, the aged seeds of 10 triticale varieties collecting from Australia were treated with 1/2 MS + 2% sucrose + 0.1% maltose + 0.5% agar under the pH

value of 5.8. The results showed that, the rates of embryo development and seedling for these aged weeds were $DH265 > Cherokee > 2090White > AT528 > WhileM96-3182-1 > AT754 > AT315$ and $Cherokee > DH265 > 2090White > AT528 > WhileM96-3182-1 > AT754 > AT315$, respectively. The rates of embryo development and seedling for these aged weeds were significantly lower than those of the normal triticale materials (CK1, CK2); The rates of embryo development and seedling for varieties 33rd ITSN, 32nd ITSN, and Rhino were 0. The suitable induction time to rescue the aged triticale seeds were 27 d.

Key words: triticale; anther culture; temperature; genotype; seed; degradation; embryo culture

目录

项目来源.....	I
摘要	II
Summary	IV
目录	VI
第一章 文献综述.....	1
1 小黑麦研究概况.....	1
2 研究背景.....	2
3 花药培养技术.....	3
3.1 影响花药培养的因素.....	3
3.2 预处理.....	6
3.3 花药培养的应用.....	7
3.4 花药培养的优缺点.....	8
4 胚培养技术.....	8
4.1 胚培养的种类.....	9
4.2 影响胚培养的因素.....	10
4.3 胚培养的应用.....	11
5 研究目的意义及内容.....	12
5.1 研究目的意义.....	12
5.2 研究内容.....	13
第二章 低温预处理和高温预培养时间对小黑麦花药愈伤组织诱导率的影响.....	14
1. 材料与方法.....	14
1.1 供试材料.....	14
1.2 供试材料种植.....	15
1.3 试验设计.....	15
1.4 试验方法.....	15
1.5 试验数据分析.....	17
2 结果与分析.....	17
2.1 幼穗低温预处理对小黑麦花药愈伤组织诱导率的影响.....	17
2.2 花药高温预培养天数对小黑麦花药愈伤组织诱导率的影响.....	20
3 讨论.....	21
3.1 幼穗低温预处理对植物愈伤组织诱导率的影响.....	21
3.2 花药高温预培养对植物花药愈伤组织诱导率的影响.....	22
4 结论	23
第三章 小黑麦不同基因型的花药培养.....	24
1. 材料与方法.....	24
1.1 材料.....	24
1.2 试验设计.....	24
1.3 数据分析.....	25
2. 结果与分析.....	25
2.1 小黑麦不同基因型的花药诱导率效果.....	25
2.2 小黑麦不同基因型的绿苗分化率.....	26

2.3 愈伤组织诱导率和绿苗分化率的相关性	27
3 讨论	27
4 结论	28
第四章 小黑麦劣化种质的胚挽救	29
1. 材料与方法	29
1.1 供试材料	29
1.2 培养基	30
1.3 种子消毒及接种	30
1.4 培养及转接	30
1.5 测定指标及方法	30
1.6 数据分析	30
2. 结果与分析	31
2.1 胚发育率	31
2.2 成苗率	34
2.3 胚发育率和成苗率的相关性分析	36
2.4 再生苗移栽的幼苗成活率、株高和叶片数	36
3. 讨论	37
4. 结论	38
第五章 结论与展望	39
1 主要结论	39
2 小黑麦花药培养研究展望	39
试验图片	41
参考文献	42
致 谢	47
导师简介	48
作者简介	49

第一章 文献综述

1 小黑麦研究概况

小黑麦 (*Triticale wittmack*) 为禾本科一年生草本植物, 由小麦 (*Triticum*) 和黑麦 (*Secale*) 经属间有性杂交和杂种染色体加倍而成, 将小麦的丰产性和籽粒的优良品质以及黑麦强的抗逆性、适应性、耐旱、耐寒、耐盐等特点表现出来, 是一种很有前途的粮饲兼用型作物^[1,2]。

随着国家农业产业结构的调整, 畜牧业由传统的耗料型 (鸡、猪) 向节粮型 (牛、羊) 方向发展以及生态环境问题日益严重, 政府采取了封山禁牧等措施, 使养殖业上遇到青饲料、粗饲料、精饲料短缺的问题^[3,4]。小黑麦具有草产量高、品质优良的特点, 在利用过程中能收获大量优质青草或秸秆, 还可作为粮食作物收获籽粒, 为青贮、青饲、籽粒精饲料等提供原材料, 其不论作为精饲料或粗饲料对奶牛、猪、兔、鸡等畜禽均有良好饲养效果, 在很大程度上解决了饲料短缺问题^[5]。小黑麦有强的抗逆性、广的适应性, 对草地生态建设和草原荒漠化治理具有重大意义。因此, 要综合解决我国在养殖业和生态建设上所遇到的问题, 应在我国各个地区种植小黑麦, 这样将既响应了国家的政策号召又会带来具大的生产和生态利益。

由于小黑麦是一种杂交而得的新型粮饲兼用作物, 其优良品种的数目和小麦, 黑麦, 玉米, 苜蓿等相差很多。我国小黑麦新品种的培育大多采用常规育种技术, 选择适宜父母本杂交后, 根据杂交后代表现, 选择符合育种目标的单株。其缺点是育种年限长、杂交后代变异范围广、工作量大、选择比较盲目, 无法打破目标性状与不利性状基因的连锁, 同时也不能满足畜牧业快速发展对草品种的需求。如果在常规育种基础上, 引进和运用现代育种技术, 就可以使品种选育向快速、高效、定向的方向发展。以花药培养技术为基础的单倍体育种, 将 F_1 或 F_2 杂合世代的花药进行离体培养, 诱导其细胞分裂, 形成单倍体胚, 进一步诱导发育成单倍体植株, 经染色体加倍, 便形成遗传背景完全同质的二倍体植株, 即双单倍体 (DH) 植株。由于 DH 植株基因型纯合, 无需多代自交纯合, 可加快育种进程, 在较短时间内培育出新品种, 达到品种改良的目的。

2 研究背景

花药培养技术是将整个花药接种到适宜的培养基上,在离体培养条件下,把花药中的小孢子诱导成单倍体植株,这是产生单倍体的主要途径之一,它具有缩短育种年限、快速获得稳定优良性状植株、提高育种选择效率等优点^[6]。利用花药培养技术可以获得大批量的双单倍体群体,该群体可以在作物育种以及建立遗传图谱等基础领域研究中应用;并且,通过花药培养技术获得的胚性愈伤组织具有稳定快、后代不分离的优点,可作为转基因的受体。由此可见,在小黑麦育种和基因工程的研究领域,花药培养技术是一个非常有效的工具。

在小麦,马铃薯,玉米,烟草等作物的花药培养技术均有相关研究,但存在较多关键问题需要对其解决,不同基因型的差异性、花药的出愈率低和愈伤组织分化绿苗率低,白化苗率高,单倍体进行加倍成功率低等。经过研究者们多年辛苦研究,虽然花药培养技术取得一些进步,但随着农业生产的不断发展,花药培养的效率对于当前的育种工作需要远远不能满足的,供体材料基因型的差异、适宜花药培养的培养基、有利于其生长的培养条件以及单倍体植株的加倍技术等因素都限制了该技术的进程,特别是许多基因型其出愈率较低、但白化苗的分化率过高、单倍体植株的加倍效率较低、田间选择的群体较少。主要原因是,对于适宜花药培养的培养基成分需要细化及培养条件的提高;花药培养的效率因基因型的差异而不同,而基因型的不同是因选择亲本材料的不一致。在田间,有些材料农艺性状表现优良,但其花药的出愈率极低,难以获得单倍体植株,而有些材料的花药出愈率很高,很容易获得单倍体植株,但其部分性状存在一些重要缺陷也无法有效的利用于实际。基于植物花药培养的基因型间的差异,有研究者试图通过优化、筛选培养基,期望得到一种能够适用于所有基因型的培养基,但尚未取得满意的研究进展。

在育种工作中,有许多新问题在不断的出现,需要我们不断的学习新的技术来完善育种体系。将品种的优良性状不断的优化,培育出更优质的材料,满足日益变化的农业生产。

例如,在长期的育种工作中会出现优质材料的种子由于自然放置时间过长而不能正常的萌发,其主要原因是由于胚乳的营养能力降低,不能提供胚萌发所需营养,所以没有保持材料的优异性状而造成优良品种的丢失,是育种工作中急需

解决的问题之一。对劣化的种子进行胚挽救技术，将完整的胚放置适宜的培养基中，让其在适宜的培养条件中生长，是模拟胚乳对的胚提供营养的方式，让其正常萌发，生长成完整的植株，将优良性状保持，提高育种效率。

3 花药培养技术

Tulecke 等^[7]在 1957 年培养了银杏 (*Gingo biloba*) 的成熟花粉粒并长出了愈伤组织，同时观察花粉粒在培养基的发育全过程。Yamada 等在 1963 年对被子植物进行花药培养并获得了单倍体的愈伤组织。印度学者 Guha 和 Maheshuari^[8]在 1964 年从毛叶曼陀罗的花药培养中获得了胚状体及再生植株，从而开辟了花药培养的研究。在随后的几年内，烟草、水稻、小麦、玉米、茄子等植物的花粉植株也被相继的获得了。在 20 世纪 70 年代初，花药培养的研究进展在很大程度上是由朱至清等^[9]建立的 N_6 培养基以及中国科学院遗传所建立马铃薯的培养基的基础上推进的。据不完全的统计，通过花药培养技术获得单倍体植株大约有 200 多种植物，以茄科和禾本科植物居多^[10]。由于花药培养方法的日趋完善，培养效率逐年提高，技术也开始更加广泛应用，成为作物改良和新品种培育工作的一个重要手段。花药培养是打破传统育种，主要以获得纯系的育种材料以及进行单倍体育种，缩短育种年限和提高育种效率的一种育种方式。花药培养的意义随着科学的发展而不断的扩大，在基础生物科学和育种领域被广泛应用。花药培养技术在基础科学领域常被作为研究遗传、生理、生化等学科的重要手段，其对于实验的胚胎学、生理学以及分子生物学中基因调控和表达机理的阐明具有重要意义^[11]。花药培养在育种领域具有广泛的应用前景，其与常规的杂交育种、远缘的杂交育种、诱变育种以及转基因技术相结合，是生物技术在农作物育种中有效方法之一。

3.1 影响花药培养的因素

虽然花药培养技术的优势很多，但由于花药培养的诱导率、绿苗分化率低的缺点使该技术目前还不能在各种作物的育种中广泛应用。将花药培养技术在育种领域广泛的运用的前提是提高诱导率，所以对于诱导率的研究也是许多研究者所热衷的。多种因素影响花药培养的诱导及分化效果，如植物体的基因型、培养的

条件、培养基的成分和各激素的含量及种类、培养方法等^[12]，这些方面被许多研究人员重点研究，为找到提高花药培养力效率的方法而努力，目前已有显著的进展。

3.1.1 外植体

基因型 同一物种的不同基因型在相同条件下进行花药培养，其花药诱导率因基因型的差异而不同。韩晓峰等^[13]用 11 个小麦品种及其组配的 20 个 F1 杂种为材料研究不同基因型的小麦花药出愈率，表明不同基因型的小麦花药出愈率有显著差异。武晓红等^[14]研究表明 5 个供试材料之间花药培养结果存在显著差异，阜平大枣的愈伤组织诱导率达 100%，而赞皇大枣仅有 46.67%；但阜平大枣的愈伤组织分化率和其他 4 个品种有显著性，为最低。并发现枣花药的出愈率和绿苗分化率的相关性差异不显著。曹禹等^[15]对 5 个冬性的小黑麦杂交组合 F1 为试验的材料进行研究基因型对花药培养的影响，表明，小黑麦的愈伤组织诱导率和基因型有显著差异性，花药愈伤组织的分化率和小黑麦材料的基因型有显著的差异。蔡正云等^[16]研究表明，在小麦组合中单一的亲本相同，而另一亲本的不相同，对出愈率、绿苗产率、绿苗分化率以及白苗分化率存在显著影响。华为等^[17]研究基因型对大麦花药培养的影响时，发现在 25 个大麦杂交组合中，花药培养效果有显著差异性，并且绿苗产率、花药出愈率、绿苗分化率之间存在极显著的正相关。贺苗苗等^[18]对 20 个马铃薯材料进行花药培养，发现不同基因型马铃薯的出愈率有显著差异，最高的马铃薯材料出愈率为 25.1%，最低的为 0，并且，部分材料可以分化绿苗，有的材料不能正常分化绿苗。苗立新等^[19]用 8 个北方粳稻品种以及 44 不完全的双列杂交 F1 代材料进行花药培养研究，发现，不同粳稻基因型的出愈率、绿苗分化率及花药培养力存在差异，杂种 F1 的特性介于双亲之间而偏向母本如绿苗分化率、出愈率、花药培养力。

提高小黑麦的花药培养技术在育种中效率的措施之一是筛选优良的基因型。将花药诱导成绿苗必须是亲本具有花药培养能力的遗传基因，进而得到后代植株，再对这些后代的植株进行花药培养，从而花药培养力因选择而提高。目前大多采用桥梁亲本的做法，用花药培养力高的材料进行花培，得到的植株作为亲本材料再进行花药培养，来解决这一问题。

小孢子发育时期 诱导单倍体雄核的发育是否成功的关键之一是确定离体培养的花药中小孢子发育时期。花粉小孢子分四分体时期、单核期（小孢子阶段）、双核期、三核期（雄配子体阶段）发育，将单核期仔细划分成单核早期、中期、晚期^[20]。由于花粉小孢子受外界刺激的反应强度因其阶段的不同而不同，所以诱导率也有差异，普遍认为单核中期到双核期是小孢子最适诱导时期。李恂等^[21]对甘蓝型油菜和芥菜型油菜的杂种小孢子进行培养时发现，当花药的颜色呈黄色或黄色中带有绿色时，表明小孢子的发育时期为三核期；当花药的颜色呈黄色并且含有绿色时，大部分的小孢子生育时期为二核期，极少数是单核晚期；花药颜色呈绿色并带有黄色和绿色为主含有少量黄色时，小孢子的生育时期为单核期；小孢子的生育时期是单核早期时花药颜色呈绿色。只有花药色为绿色带黄色和绿色带少量黄色时可产生大量胚。谢淼等^[22]研究表明黄瓜的小孢子最适宜花药培养的时期是单核中后期，在花药呈白绿色或淡绿色、花蕾的颜色为绿色、长度为 0.9-1.5 cm、瓣尖还未张开时进行取蕾。李允菲等^[23]对红花槐花药最适宜的取材时间进行研究，发现适宜离体花药培养的小孢子在单核时期（单核早中期及单核靠边期）最佳，并表明在单核靠边的生育时期时花药出愈率最高，可作为红花槐进行离体花药培养的最佳生育时期。

材料发育时期和生长环境对花药培养的影响 供体植株的生理状态对花药培养成败也有影响，取材母株的生理条件是控制的重要因素之一。而供体植株的生理状态对花药培养又受到环境的影响，例温度、光照度、光周期、光质、植株营养状况等。曹鸣庆等^[24]对大白菜的供体植株生长环境进行研究，结果表明温度对植株的小孢子胚胎的发生具有显著影响，供体植株在局部控温的温室 10/20℃（夜/昼）的环境中生长，其小孢子的胚产量较高；而在无法对温度进行调控、午间最高温度为 30-40℃、夜间温度降至 10-15℃左右时，供体植株在温度变化的田间生长，胚产量仅为前者的 29.5%。欧阳西荣等^[25]研究表明大麦的供体材料生长环境条件对花药培养有很大影响，供体材料的生长环境条件对其愈伤组织和胚状体的产量、花药反应数量、分化再生体的数量均有显著影响。

3.2 预处理

3.2.1 低温预处理

对于现在的花药培养技术，一种应用较广，可以提高花药培养的诱导率的措施为低温预处理。不同的温度预处理的时间不同。温度越低，处理的时间越短，温度越高，处理的时间越长。 0°C 以上的低温预处理可以提高花粉植株的诱导率。Nitsche 和 Norreel 在 1973 年对花药培养前进行低温预处理曼陀罗花芽并将单倍体植株的诱导率提高的文章被首次报道^[26]。张春芬等^[27]选用胚状体诱导效率较高的 3 个苹果品种进行低温预处理，结果表明在低温预处理的时间为 20-36 d 较好。谢淼等^[22]研究低温预处理对黄瓜花药培养的效果影响中表明低温预处理有利于保持小孢子的活力并花药在 4°C 黑暗条件下进行 48-72 h 的低温预处理最有助于出愈率的增加。由此表明，不同材料或基因型在相同条件的低温预处理的环境中进行花药培养，因不同的研究者所用试验材料、试验方法、处理细节等不同而存在显著性差异。

3.2.2 高温预处理

目前，较多国内外的研究者对植物花药进行高温预处理，表明高温预培养对花药的出愈率有显著增加，但不同植物或相同植物的不同品种对高温预培养响应不同。袁惠燕等^[28]对不结球白菜杂种 F1 代的花药进行高温预处理培养，结果表明，对花药进行 33°C 的高温预培养 24 h 的处理可明显提高花药再生植株的诱导率。吕学莲等^[29]研究表明进行高温预培养花药的愈伤诱导率比不进行高温培养的高，但不同品种的最适宜高温诱导时间不同，是否对物种进行高温暗培养以及培养的最适宜时间和基因型有显著关系，需要通过大量的基因型材料进一步加以验证。甘蓝花药培养和小孢子培养经高温诱导处理可形成从圆球形至子叶形不同发育时期的胚，未经高温处理的材料不能形成小孢子胚^[30]。

3.3 花药培养的应用

3.3.1 育种中的应用

由于花药培养技术可培育出单倍体植株,通过加倍而获得纯合的二倍体,这种特性使其能与远缘杂交育种、转基因技术、传统杂交育种、诱变育种完美的结合而获得较有成效的结果,并应用于作物栽培中。离体培养 F_1 代杂交种的花粉获得单倍体植株再对其染色体加倍进而获得纯合的二倍体植株缩短了育种周期,同时重组型选择的概率也增加了。并且,由于是纯合的二倍体群体,固定了所有纯合的基因,所以在以后的世代中目标性状的等位基因不会因分离而丢失,进而对质量性状的数量性选择的效率被提高了。我国把花药培养育种与常规育种有机结合起来,已先后育成小麦^[31]、水稻^[32]、玉米^[33]、甘蓝型油菜^[34]、胡萝卜^[35]、茄子^[36]等作物花药培养新品种。

3.3.2 转基因受体

转基因技术理想的靶受体之一是单倍体培养^[20]。原生质体在过去的高等植物转基因常被作为受体。近年来胚性愈伤组织、子叶节、原生质体、茎尖等都被作为转化的受体,使转化受体变的多样性,但缺点就是这项技术的成功率很低,只能在极少数的几个品种中应用,并且具有极低的再生率和极高的假阳性。所以,将转基因受体转向单倍体培养是许多研究者都在进行的并取得的进展较大。斯华敏等^[37]对转基因的植株进行花药培养,发现可以获得纯系通过快速纯合外源基因。朱丽等^[38]获得阳性转基因的植株通过筛选潮霉素磷酸转移酶基因和目的基因用农杆菌介导水稻的转化体系进行的,快速得到了无选择标记并且目的基因是阳性转基因的纯合植株通过将单株进行花培,得率为 9.87%。通过 RT-PCR 检测表明外源基因已整合到转基因水稻基因组中并转录。

3.3.3 基因定位

许多重要农艺性状均是数量性状,这些性状受基因的控制,同时环境等因素也可将其影响。传统数量遗传的分析方法对其单个遗传位点、染色体上位置以及

和其他基因连锁关系不能被测检出,但高密度饱和的分子标记连锁图建立使其成为可能^[39,40]。由于加倍单倍体群体无遗传变异以及含有小量的信息,可以作为数量性状位点分析的良好群体。目前,在小麦^[41]、水稻^[42]、大麦^[43]和烟草^[44]等作物中都报道了由加倍单倍体群体构建的遗传图谱,已经对产量、株高、抗病性和生理生化等复杂数量性状的数量性状位点定位进行了大量的报道^[45]。

3.4 花药培养的优缺点

单倍体培养包括小孢子培养和花药培养,但二者却各有优缺点。前者是单细胞培养,后者是器官培养。花药培养技术比小孢子的培养要求简单,容易成活,并且愈伤组织诱导率高,但该技术具有存在花丝、花药壁、药隔等体细胞组织的干扰的缺点,易造成非单倍体的体细胞植株。小孢子培养技术是利用花粉细胞,由于不存在一些体细胞的干扰,它诱导产生纯合的二倍体及多倍体植株。了解雄核发育的全过程可用小孢子的培养而进行观察,来研究遗传的发育。然而,与花药培养相比,游离小孢子的培养可以通过胚胎的发生途经进而发育成植株,从而避免愈伤组织的阶段;小孢子具有单倍体和单细胞两方面优点,小孢子培养具有产生单倍体不受体细胞影响的优势,还可作为研究胚胎发生和形态发生机理的理想工具之一;小孢子培养也可为遗传工程研究提供受体,同时小孢子培养具有周期短,工作量小等优点^[46]。

4 胚培养技术

胚在植物中,是一个具有全能性的多细胞,其有两种来源,一是有性来源,为合子胚;还有作为体细胞胚或不定胚的无性来源。胚能在正常的情况和适宜条件下发育成熟,并且可以直接播种生长完整的植株。胚培养技术主要是针对合子胚的培养,是现代生物技术应用领域的一个重要方面,具有是指将幼胚、成熟胚或整个珠心组织从活体的胚珠或种子中取出,置于一定的培养条件下(如适宜的培养基及激素配比、光照、温度等)进行离体培养,使其发育直至萌发形成完整植株的过程和技术。

最早研究胚培养的可追溯到 18 世纪,Charles Bannet 切取 *phaseolus* 的胚种植在土壤中得到植株,这是首次研究胚脱离母体而正常萌发^[20]。此后于 1890 年

开始研究营养液培养离体胚。而真正采用含有各种有机和无机成分培养基培养离体胚始于 1904 年。Hanning^[47]最先试验了幼胚的离体培养，他们将萝卜属和辣根菜属植物的未成熟胚进行培养，培养基中含有氨基酸、糖、无机盐、植物提取物，幼胚正常发育成为成熟胚。Laibach^[48]在无菌环境中剥离出未成熟的杂种胚从亚麻属的种间杂交形成不能正常的发育种子中，将其培养在含有 10%-15%蔗糖的人工培养基上，待其发育成熟并产生杂种的完整植株。进而证明了在自然情况下败育的杂种胚可利用幼胚离体培养进行挽救。随后国内外研究者，尤其是育种家和植物学家，开始对植物胚培养做了大量研究。尤其是在胚胎发育进程以及在种间杂交、远缘杂交无法获得正常发育种子的胚挽救培养中发挥了巨大的优势和作用。目前，胚培养技术已经被广泛地用于植物细胞、遗传研究和农作物育种工作。

4.1 胚培养的种类

植物在受精后，其合子胚经过一个短暂的休眠后就开始发育，其营养主要来源于胚乳。发育的胚在心形胚前（处于异养阶段）越小，培养时营养物质的需要就越复杂。最适于胚进行离体培养的时期是心形胚后期（处于自养阶段），因此胚的生长发育不依赖外源的生长调节物质^[49]。离体胚培养是胚在发生过程中培养不同发育时期的胚，可将胚培养分为两种主要类型，成熟的胚培养和幼胚培养，但这两种类型的胚对培养条件的要求有极大的差异。

4.1.1 幼胚培养

在子叶期以前具有胚结构的幼小胚称为幼胚，主要来源于未成熟的或不能正常萌发的杂种种子，如种间杂交、远缘杂交以及不同倍性品种间的杂交的种子。因母体和胚乳给在胚珠中异养的幼胚提供各类营养和生物活性的物质。因此，分离这种胚时需要耐心仔细，并且必须通过培养基向幼胚提供足够的营养物质和适宜的培养条件才能将其培养成植株。因越小的胚越难进行培养，所以尽量对较大的胚进行培养。

4.1.2 成熟胚培养

子叶期后到发育完全的胚称为成熟胚，主要来源于成熟种子，它已经具备了能够满足自身萌发和生长的养料。因此，这类培养相对比较容易，因为种胚仅需要含无机盐、蔗糖和琼脂的培养基就可以生长发育。成熟胚培养的目的主要是解除对种子萌发的抑制。

4.2 影响胚培养的因素

4.2.1 基因型

胚培养的效果受基因型的影响是复杂而又重要的。不同的植物种类或品种胚培养存在很大差异。祁业凤等^[50]用优良的冬枣、金丝丰等品种为试验材料，对坐果后 10-70 d 的幼胚进行培养，结果表明，二者无论在植株再生率还是再生植株的质量上均有明显差异。刘三军等^[51]对无核葡萄在胚挽救育种过程中表明，选择合适的无核品种作为杂交亲本是非常关键的。

4.2.2 培养基

将在不同生育时期剥离下来的胚在适宜的培养基进行培养并且其能发育成熟，是胚培养中最重要的问题之一。根据胚胎发育程度的不同，它们所需营养需求也不同。幼胚离体培养的培养基成分也与成熟胚培养的培养基成分不同。刘佳等^[52]对无核葡萄胚挽救的几个培养基进行筛选表明，在胚珠发育阶段，最适宜离体幼胚发育的培养基是 ER 培养基中添加 1.0 mg/L 6-BA 、1.5 mg/L IBA、0.5 mg/L GA3 激素；在胚萌发阶段，最适宜离体胚萌发的培养基是 WP 培养基中添加 0.5 mg/L 6-BA 、1.0 mg/L IBA、0.5 mg/L GA3 的激素。张满让等^[53]通过对几种培养基的比较试验，发现早熟油桃胚培养的最高萌发率是在 WPM 培养基中，为 95.56%。

4.2.3 胚龄

胚的萌发成活率一般与胚的发育程度呈正相关,即胚在发育程度较低时,胚的成活率低以及胚发育的阶段早;随着胚的继续发育,其成活率在不断的高及发育程度也较高;同时,胚龄与畸形苗频率呈负相关,胚的发育程度越低,畸形苗率越高。所以,确定杂交幼胚的适宜胚龄是胚挽救培养成功与否的关键因素之一。潘春云等^[54]发现,杂交胚的成苗率在授粉后 35 d-50 d 时较高,最高达 5.32%。李世诚等^[55]研究表明,杂交胚的母本是二倍体进行胚挽救培养的最适时间是授粉后 58 d,而杂交胚的母本是四倍体时最适进行胚挽救培养的时间是授粉后 30 d,在此时间进行培养可得较高的胚萌发率。

4.3 胚培养的应用

4.3.1 克服杂种胚败育

高等植物的种间和属间进行远缘杂交时,经常遇到花粉萌发但花粉管不能正常生长而伸入子房不亲和现象、花粉在异种植物上不能正常萌发、胚乳发育不良使杂种胚的早期败育等问题^[56]。因胚乳发育不正常或胚和胚乳之间在生理上不协调导致杂种胚早期的败育,在胚败育之前取出培养使其产生杂种植物是一种有很多成功例子的育种手段。

4.3.2 克服种子休眠, 缩短育种周期

许多种子胚在达到形态成熟后,都必须经历一个自然休眠的过程,即在休眠期内胚在适宜的温度、氧气和湿度条件中不能萌发。为克服这类种子在发育上的遇到的障碍可将种子进行离体胚培养促进胚的生长而发育成完整植株^[49]。

4.3.3 提高萌发率和成苗率

像油桃、樱桃、桃、杏等这些早熟园艺作物品种,因果实具有较短的发育期,使其种胚难以正常发育成熟,从而导致直接播种难以萌发成苗。一些植物的种子

由于在自然环境中放置时间过长而导致种子劣化,其胚乳不再有提供胚发育营养的能力,所以选用适宜的培养基对劣化种子的胚进行胚挽救,提高其萌发率和成苗率。

4.3.4 多倍体育种

选育无籽(核)品种已成为当今园艺作物育种的重要目标,而三倍体育种是实现这一目标重要途径之一。获得三倍体无籽(核)品种,最有希望的方法是二倍体与四倍体间的杂交,但其最大障碍是亲和力差,杂种胚早期败育,种子生活力差,很难获得杂交后代^[57]。为防止杂交幼胚的早期败育,在其合子胚败育之前利用离体的胚挽救技术进行培养,让其利用自身的胚乳和培养基中的营养发育成正常的胚而最终获得完整的植株。

5 研究目的意义及内容

5.1 研究目的意义

我国小黑麦新品种的培育大多采用常规育种技术,选择适宜父母本杂交后,根据杂交后代表现,选择符合育种目标的单株。其缺点是育种年限长、杂交后代变异范围广、工作量大、选择比较盲目,无法打破目标性状与不利性状基因的连锁,同时也不能满足畜牧业快速发展对草品种的需求。如果在常规育种基础上,引进和运用现代育种技术,就可以使品种选育向快速、高效、定向的方向发展。以小孢子培养技术为基础的单倍体育种,将 F_1 或 F_2 杂合世代的花药进行离体培养,诱导其细胞分裂,形成单倍体胚,进一步诱导发育成单倍体植株,经染色体加倍,便形成遗传背景完全同质的二倍体植株,即双单倍体(DH)植株。由于DH植株基因型纯合,无需多代自交纯合,可加快育种进程,在较短时间内培育出新品种,达到品种改良的目的。为完善小黑麦花药培养技术体系,为小黑麦单倍体育种奠定基础。本论文在项目组前期研究基础上,研究低温(4°C)预处理时间(15 d, 20 d, 25 d, 30 d, 35 d, 40 d)和高温(32°C)培养时间(0 d, 1 d, 2 d, 3 d)对小黑麦花药培养的影响,以及小黑麦不同基因型(石大1号小黑麦品种,甘农1号小黑麦品种,小黑麦品系P4, TZ3, TZ10, TZ12, TZ23, TZ25, TZ26)的花

药培养效果。

牧草饲料作物种子如果在常温下存放时间太长,种子会发生劣化,使种子发芽力降低或丧失发芽能力。为获得劣化小黑麦品种种子的再生苗,对种质资源进行挽救。本研究将从澳大利亚引进的 10 个小黑麦品种的劣化种子的胚在 1/2MS+2%蔗糖+0.1%麦芽糖+0.5%琼脂、pH 5.8 的培养基中进行培养,以挽救劣化小黑麦种质资源。

5.2 研究内容

5.2.1 低温预处理和高温预培养时间对小黑麦愈伤组织诱导率的影响

5.2.2 小黑麦不同基因型的花药培养效果研究

5.2.3 小黑麦劣化种质的胚挽救技术研究

第二章 低温预处理和高温预培养时间对小黑麦花药愈伤组织诱导率的影响

花药培养技术是单倍体育种的基础,其具有在短时间改良品种,稳定优良遗传性状,加快育种进程等优点。如果在常规育种基础上,引进和运用现代育种技术,就可以使品种选育向快速、高效、定向的方向发展。以花药培养技术为基础的单倍体育种,将 F_1 或 F_2 杂合世代的花药进行离体培养,诱导其细胞分裂,形成单倍体胚,进一步诱导发育成单倍体植株,经染色体加倍,便形成遗传背景完全同质的二倍体植株。因纯合二倍体具有遗传稳定性和性状不分离的特点,所以通过花培技术可以在较短时间内培育新品种,达到品种改良的目的。

为了提高花药培养的出愈率,对接种的花药进行温度预处理是有必要的。温度预处理有利于细胞的脱分化,对小孢子离体培养反应能力也有所提高。研究者在马铃薯^[58],水稻^[59],辣椒^[60],小麦^[13]等作物中对其花药进行温度处理,均表明高低温预处理可显著提高花药愈伤组织的出愈率。本研究拟筛选小黑麦花药培养的适宜低温预处理时间和高温预培养时间,以优化小黑麦花药培养技术,提高花药培养效率。

1. 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 幼穗低温预处理对花药愈伤组织诱导率的影响

本试验以石河子大学选育的石大 1 号六倍体小黑麦和甘肃农业大学草业学院选育的甘农 1 号六倍体小黑麦为试验材料。

1.1.2 花药高温预培养时间对花药愈伤组织诱导率的影响

本试验选用石河子大学选育的石大 1 号小黑麦和甘肃农业大学草业学院选育六倍体小黑麦新品系 P4 为试验材料。

1.2 供试材料种植

所有供试材料于 2016 年春季种植于兰州市安宁区甘肃农业大学牧草试验站。小区面积 10 m²，行长 2 m，行距 0.2 m，播种深度 3~4 cm。石大 1 号、甘农 1 号小黑麦和小黑麦品系 P4 分别种植 6 行。

1.3 试验设计

幼穗低温预处理时间对花药愈伤组织出愈率的影响 将甘农 1 号和石大 1 号小黑麦的幼穗分别在 4 ℃ 下进行 15 d，20 d，25 d，30 d，35 d，40 d 的低温处理，将花药接种于 CHB 培养基中诱导 30 d，统计愈伤组织数量，再进行分化培养，比较不同幼穗低温预处理时间下愈伤组织的出愈率，以筛选最适幼穗低温预处理时间。

花药高温预培养时间对诱导率影响 将小黑麦新品系 P4 和石大 1 号小黑麦的幼穗在 4 ℃ 冰箱进行 20 d 幼穗低温预处理，花药接种于 CHB 培养基中，分别在 32 ℃ 高温培养箱暗培养 0 d，1 d，2 d，3 d 后再转 28 ℃ 培养箱暗培养 30 d。对照在 28 ℃ 培养箱暗培养，诱导 30 d，统计愈伤组织数量。比较各高温诱导培养之间愈伤组织数量的差异，筛选出最佳高温诱导培养时间。

1.4 试验方法

1.4.1 幼穗低温预处理

取石大 1 号和甘农 1 号小黑麦单核靠边期的幼穗（形态学上表现为，幼穗 1/2 的部位到达倒二叶叶耳部位），用剪刀沿着茎部剪断幼穗，同一基因型材料用锡箔纸包裹捆成一捆，标好采集日期和基因型，然后放入装有冰块的小桶中，尽快带回实验室。将用锡箔纸包好的小黑麦幼穗放置于装有 200 ml 自来水的 500 ml 烧杯中。按照幼穗低温预处理的设置时间，在 4 ℃ 冰箱中避光保存，进行幼穗低温预处理。

1.4.2 花药高温预培养

取石大 1 号和小黑麦品系 P4 单核靠边期的幼穗（形态学上表现为，幼穗 1/2 的部位到达倒二叶叶耳部位），用剪刀沿着茎部剪断幼穗，同一基因型材料用锡箔纸包裹捆成一捆，标好采集日期和基因型，然后放入装有冰块的小桶中，尽快带回实验室。将用锡箔纸包好的小黑麦幼穗放置于装有 2-3 cm 自来水的烧杯中。在 4 °C 冰箱中避光保存 20 d。

1.4.3 培养基与试验操作

灭菌：用紫外灯照射超净工作台 30 min。将配置好的培养基放置于 121°C 的灭菌锅中灭菌 20 min，取出后放置于灭菌的超净工作台上，待温度降低后，将培养基分置于 90 mm 的培养皿中，2-3 cm 厚度，静置，备用。

将超净工作台用紫外灯照射 30 min 后，将包有锡箔纸的小黑麦幼穗用 75% 酒精消毒后，放入超净工作台。在无菌操作台上，去除锡箔纸，取出小黑麦幼穗，用 75% 乙醇润湿的大块滤纸对其擦拭进行消毒 2-3 次，去处叶鞘，剥出幼穗，用消毒的剪刀去芒，将去过芒的幼穗用次氯酸钠溶液对其消毒 5-10 min，倒出次氯酸钠溶液，再用无菌水冲洗 4-5 次，直到没有泡沫为止，取出，用无菌滤纸干燥，备用。

接种花药：取大小镊子各 1 把，放入 75% 乙醇中浸泡后，用酒精灯外焰烤火灭菌，之后放在灭菌的培养皿上冷却备用。用大镊子夹住已灭菌的小黑麦幼穗，再用小镊子去掉内外颖剥出花药。剥取花药和接种期间，超净工作台每隔 30 min 喷洒 75% 酒精进行消毒，全过程在酒精灯附近进行。

愈伤组织诱导培养：将取出的小黑麦花药，放入装有 20 ml CHB 诱导培养基上，诱导培养基为：CHB 培养基+0.5 mg · L⁻¹ 2,4-D+0.5 mg · L⁻¹ KT+90 g · L⁻¹ 麦芽糖+6 g · L⁻¹ 琼脂，pH 为 5.4。每个培养皿接种花药 70 个，接种完成后用封口膜密封。每个处理接种 5~8 个培养皿。1) 把密封的石大 1 号和甘农 1 号小黑麦的培养皿（幼穗低温预处理试验）放入 28°C 培养箱中进行暗培养。2) 把密封的石大 1 号和 P4 小黑麦品系的培养皿（花药高温预培养试验）按照花药高温预培养的试验设计，在 32°C 恒温暗培养箱中培养不同天数后，将所有培养

皿放置于 28℃培养箱中进行暗培养。

愈伤组织分化培养：将小黑麦不同基因型直径 1~2 mm 左右、颜色呈现淡黄色、结构比较致密的愈伤组织转移到分化培养基上，分化培养基为：Ms 培养基+1 mg·L⁻¹ IAA+1 mg·L⁻¹ BAP+10 g·L⁻¹ 山梨醇+30 g·L⁻¹ 蔗糖+6 g·L⁻¹ 琼脂，pH5.8。每处理接 4~6 皿，每皿 6~8 块愈伤组织，置于 27℃、2000~3000 Lx，14 h 光照培养，10 h 暗培养进行培养，每周更换一次培养基，30 d 后统计愈伤组织分化率及绿苗分化率。

移植和染色体加倍：在分化培养基中将多于 4 片叶片的单株转移到装有营养土的小盆中，将盆放在温度为 15-20℃、有良好光照条件的温室中培养。当无菌苗出现 3 个分蘖时，将苗从盆中移出，将根系长度剪至 2 cm，放置于装有 3-5 cm 深的 0.1%秋水仙素+2%二甲基亚砷+0.05% Tween-20 的条件中静置 5 h 进行加倍。之后用流动的水将根系冲洗干净，再重新种植到花盆中，放到温室中恢复生长两周后，移栽到大田中正常生长。在温室恢复生长的这段时间中，定期用 1/4Ms（无有机物）液体营养液施肥。

1.5 试验数据分析

花药接种诱导培养基后，在试验设计的时间进行统计各处理胚状体的发育状况或花药愈伤组织数目。

愈伤组织诱导率=诱导出愈伤组织的花药个数/总接种的花药个数×100%

用 SPSS19.0 软件中二因素随机区组试验设计的统计方法，分别分析不同品种小黑麦在不同处理的愈伤组织诱导率及绿苗分化率的差异显著性。用 EXCEL 进行数据整理和作图。

2 结果与分析

2.1 幼穗低温预处理对小黑麦花药愈伤组织诱导率的影响

由表 2-1 可知，小黑麦基因型间、幼穗低温预处理天数间以及小黑麦基因型×幼穗低温预处理天数交互作用间愈伤组织诱导率均存在极显著差异（ $P<0.01$ ），需进行多重比较。

表2-1 小黑麦花药幼穗低温预处理的出愈率方差分析

Table 2-1 Variance analysis on the induction rate of tritcale anther after low temperature pretreatment

指标 Index	df	F 值 F value
小黑麦基因型间 Within tritcale genotypes	1	916.09**
幼穗低温预处理天数间 Within days of low temperature pretreatment	5	1992.67**
小黑麦基因型×幼穗低温预处理天数 Triticale genotypes × Days of low temperature pretreatment	5	855.37**

注: *达到显著水平 ($P<0.05$); **达到极显著水平 ($P<0.01$)。下同

Notes: *Mean significant difference at 0.05 level; ** Mean significant difference at 0.01level. Same of below

2.1.1 小黑麦基因型间愈伤组织出愈率的差异

石大 1 号的出愈率 (6.94%) 显著高于甘农 1 号 (2.95%) ($P<0.05$)。

2.1.2 幼穗不同低温预处理天数间小黑麦愈伤组织诱导率的差异

由表 2-2 可知, 随着幼穗低温预处理时间的延长, 小黑麦愈伤组织出愈率逐渐增加, 25 d 时花药出愈率最高, 显著高于其余幼穗低温预处理天数; 之后随着预处理天数增加, 诱导率又开始下降, 幼穗低温预处理 30 d 时, 小黑麦花药出愈率次之, 显著高于其余除 25 d 之外的其余预处理天数; 幼穗低温预处理 40 d 时, 小黑麦花药出愈率居第 3 位; 预处理 35 d 和 20 d 时, 愈伤组织诱导率相近; 幼穗低温预处理 15 d 的花药出愈率最低, 显著低于其余幼穗低温预处理时间的出愈率。

表 2-2 小黑麦幼穗不同低温预处理天数间出愈率的差异

Table 2-2 Differences of the induction rate of tritcale anther under different low temperature pretreatment

幼穗低温预处理天数 Days of low temperature pretreatment / d	出愈率 Callus induction rate of anther /%
15	1.17 e
20	2.16 d
25	17.27 a
30	4.79 b
35	2.40 d
40	3.90 c

注: 同列不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下同

Notes: Different letters within the same column mean significant differences at 0.05 level. Same as below.

2.1.3 小黑麦基因型×幼穗低温预处理天数交互作用间出愈率的差异

由图 2-1 可知,随着幼穗低温预处理时间的延长,小黑麦不同基因型愈伤组织诱导率的变化不同:甘农 1 号小黑麦的花药出愈率随着幼穗低温预处理时间的延长先上升再下降又上升,石大 1 号小黑麦的花药出愈率随着幼穗低温预处理时间的延长为先上升再下降。在幼穗低温预处理 15 d 时,甘农 1 号和石大 1 号小黑麦的花药出愈率无显著差异,且花药出愈率低。预处理 20 d 时,甘农 1 号小黑麦的花药出愈率(3.18%)显著($P<0.05$)高于石大 1 号,此时甘农 1 号小黑麦的花药出愈率显著高于 15 d,但石大 1 号小黑麦的花药出愈率和 15 d 无显著差异。预处理 25 d 时,2 小黑麦基因型的出愈率均达最大(甘农 1 号 8.22%,石大 1 号 26.33%),显著高于其他处理,而且石大 1 号的增幅较大,显著高于甘农 1 号小黑麦。预处理 30 d 和 35 d 时,甘农 1 号小黑麦的花药出愈率均显著低于石大 1 号。预处理 40 d 时,甘农 1 号的花药出愈率(5.62%)又显著高于石大 1 号。

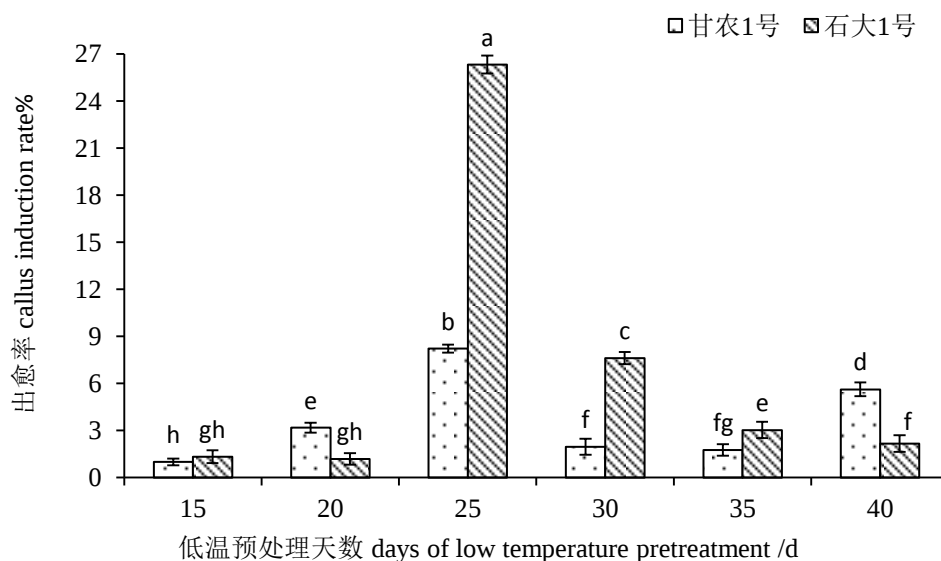


图 2-1 小黑麦基因型×幼穗低温预处理天数交互作用间愈伤组织出愈率的差异

Fig. 2-1 Differences of callus induction rate of the interaction between triticale materials and days of low temperature pretreatment

注: 柱形图间不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下同

Notes: Different letters on the columns represent significant difference at the 0.05 level ($P<0.05$). Same of below

2.2 花药高温预培养天数对小黑麦花药愈伤组织诱导率的影响

由表 2-3 可知, 小黑麦基因型间、花药高温预培养天数间以及小黑麦基因型×花药高温预培养天数交互作用间小黑麦花药的愈伤组织诱导率存在极显著差异 ($P<0.01$), 需进行多重比较。

表 2-3 小黑麦花药高温预培养出愈率的方差分析

Table 2-3 Variance analysis on the callus induction rate of tritcale under different high temperature pre-treatment

指标 Index	df	F 值
小黑麦基因型间 Within tritcale genotypes	1	7989.90**
花药高温预培养天数间 Within days of high temperature pre-treatment	3	5487.01**
小黑麦基因型×花药高温预培养天数间 Triticale genotypes × Days of high temperature pre culture	3	7926.66**

2.2.1 小黑麦基因型间愈伤组织诱导率的差异

石大 1 号小黑麦愈伤组织的诱导率(18.1%)显著高于小黑麦新品系 P4(3.83%) ($P<0.05$)。

2.2.2 花药高温预培养天数间愈伤组织出愈率的差异

由表 2-4 可知, 高温预处理 2 d 时, 小黑麦花药出愈率显著高于 CK 和其余高温预处理; 高温预处理 1 d 的花药出愈率次之, 显著高于 CK 和预处理 3 d 的出愈率; 预处理 3 d 的花药出愈率最低, 显著低于 CK 和其余花药高温预培养天数。

表 2-4 花药高温预培养天数间小黑麦愈伤组织出愈率的差异

Table 2-4 The difference of the induction rate of anther in tritcale under different high temperature pre culture

花药高温预培养天数 Days of high temperature pretreatment /d	愈伤组织出愈率 Callus induction rate %
0 (CK)	5.59 c
1	6.90 b
2	28.53 a
3	2.84 d

2.2.3 小黑麦基因型×花药高温预培养天数交互作用间小黑麦愈伤组织出愈率的差异

如图 2-2 所示,随着高温预处理时间的增加,小黑麦品系 P4 花药愈伤组织的诱导率先降低再增加,但均低于未进行花药高温预培养的诱导率;石大 1 号小黑麦愈伤组织诱导率先增加,预培养 2 d 时诱导率达最大,之后又降低。未进行高温预处理时,P4 的愈伤组织诱导率(10%)显著高于石大 1 号(1.18%)($P<0.05$);花药高温预培养 1 d 和 2 d 时,P4 的愈伤组织诱导率均显著低于石大 1 号,而且 P4 花药高温预培养 1 d 和 2 d 的愈伤组织诱导率无显著差异,但石大 1 号的愈伤组织诱导率有显著差异,预培养 2 d 时愈伤组织诱导率最大(56%);花药高温预培养 3 d 时,P4 的愈伤组织诱导率增加,而石大 1 号却降低。

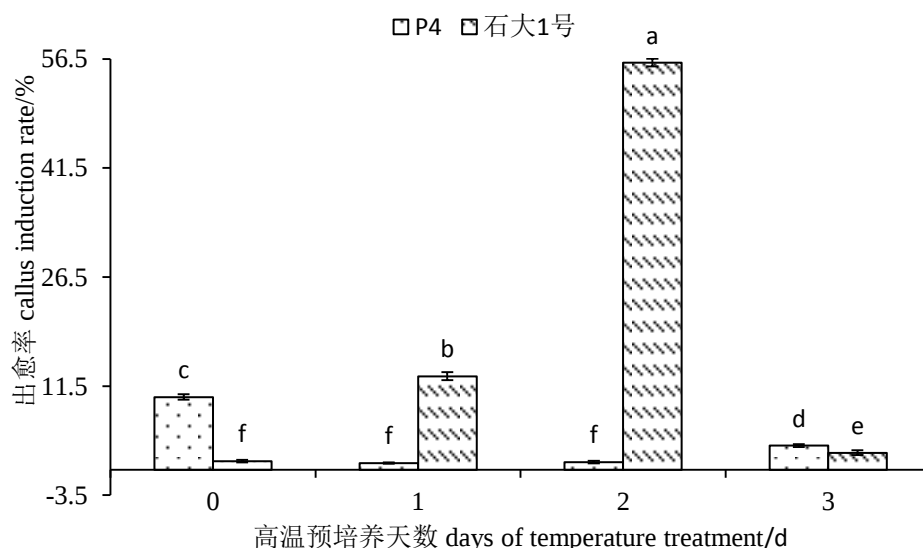


图 2-2 小黑麦基因型×花药高温预培养天数交互作用间愈伤组织诱导率的差异

Fig. 2 Differences of callus induction rate of the interaction between triticale materials and days of high temperature pretreatment

3 讨论

3.1 幼穗低温预处理对植物愈伤组织诱导率的影响

对植物花药进行幼穗低温预处理,使花粉粒的纺锤体微管蛋白解聚,纺锤体难以形成,正常有丝分裂被打乱,造成细胞分裂的异常。幼穗低温预处理能够延缓花粉退化和药壁组织衰老,降低花粉死亡率,让更多花粉能够开始新细胞周期

^[61]。Nitsch 等^[62]试验表明, 低温处理毛叶曼陀罗的花序后, 花粉胚胎和胚状体的产量明显提高。这种现象在小麦^[61]、玉米^[63]、大麦^[64]、和水稻^[65]等禾本科作物中也陆续被发现。陈春艳等^[66]研究表明, 烟草花药在 4℃ 幼穗低温预处理 48 h 后进行接种, 其愈伤组织的诱导率明显提高。宋运贤等^[67]研究表明, 幼穗低温预处理 2 d 后, 小麦花药愈伤组织的诱导率最高, 幼穗低温预处理 6 d 时胚性愈伤组织的比例最大。主要是因为, 幼穗低温预处理后小麦花药内源激素的含量和比例发生改变, 花粉原来发育方向被阻断, 使其由配子体发育途径转向孢子体发育途径, 从而影响小麦花药培养诱导产生愈伤组织的数量和质量^[61]。本试验对不同基因型的小黑麦花药进行幼穗低温预处理 25 d 时, 出愈率均最高, 但在相同幼穗低温预处理时间下, 不同小黑麦基因型花药的出愈率不同。随着幼穗低温预处理时间的延长, 不同小黑麦基因型愈伤组织出愈率的变化趋势也不同, 甘农 1 号小黑麦在幼穗低温预处理 40 d 时, 花药的出愈率虽低于 25 d, 但高于其余预处理天数; 幼穗低温预处理 15 d 时, 花药的出愈率最低。但石大 1 号小黑麦在幼穗低温预处理 30 d 时, 愈伤组织的出愈率虽低于 25 d, 但高于其余预处理天数; 幼穗低温预处理 20 d 时, 愈伤组织的出愈率最低。

3.2 花药高温预培养对植物花药愈伤组织诱导率的影响

花药高温预培养对植物花粉胚和愈伤组织诱导率的影响机理鲜有报道。有的研究者认为, 高温预处理使内源激素和蛋白质的产物发生改变^[68]。张跃非等^[69]研究表明, 培养前对水稻花药进行高温热击的最适温度为 35℃, 最适时间是 24 h。如果花药进行短时间的、低温热处理对愈伤组织形成和绿苗分化具有有不利影响。但如果花药进行长时间的高温热处理又会使白化苗数量急剧增加。另外, 从暗培养转入光培养的时间对愈伤组织分化绿苗的产率也有一定影响, 转移过早, 则再分化率比较低, 出苗率低; 转移过迟, 则愈伤组织由于老化而颜色变暗或褐化, 使其表面易形成硬壳, 进而难以继续分化或分化出白化苗的数量增多, 所以愈伤组织的直径为 2-3 mm 时转移最佳。倪胜利等^[10]研究得出, 对花药进行适当的高温培养 (5-10 d), 可以提高小麦花药的愈伤组织诱导率。胡冬梅^[70]研究表明, 对小麦花药进行 32℃ 的高温培养 8 d, 可以显著提高各小麦品种的愈伤组织诱导频率。吕学莲等^[71]研究表明, 花药高温预培养使小麦愈伤组织的诱导频率显著

提高。本试验结果表明,不同小黑麦对花药高温预培养的反应不同:小黑麦品系 P4 的花药经花药高温预培养后,愈伤组织诱导率显著下降,而石大 1 号小黑麦的花药经花药高温预培养后,出愈率显著增加,预培养 2 d 时出愈率最高。为进一步确定花药高温预培养对小黑麦花药培养的影响,还需增加参试基因型数量。

4 结论

4.1 幼穗低温预处理 25 d 时,参试小黑麦愈伤组织的诱导率最高。

4.2 花药高温预培养对小黑麦不同基因型愈伤组织诱导率的影响不同。石大 1 号小黑麦的花药在花药高温预培养 2 d 时,愈伤组织诱导率最高;小黑麦品系 P4 的花药经花药高温预培养后诱导率反而降低。

第三章 小黑麦不同基因型的花药培养

效果研究

花药培养的效率受很多因素影响,如花粉粒的生育时期,植物基因型,花药诱导培养基中各激素的含量,以及预处理和诱导时间等^[72]。唐选明等^[73]利用小黑麦的单倍体性胚性愈伤组织,获得了再生绿苗。魏凌基等^[74]研究发现,蔗糖浓度低于 4%时,穗结实率随蔗糖浓度的上升而增加。柴守玺等^[75]发现,赤霉菌有毒的代谢物会抑制小黑麦愈伤组织的生长和发育。曹禹等^[15]和孙娜等^[76]研究发现,基因型和培养基对冬性小黑麦愈伤组织的诱导率存在显著影响,但部分春性小黑麦对基因型和培养基的影响差异不显著,同时也表明愈伤组织的诱导率对激素、碳源的调整存在一定程度的反应,但无显著差异。Marciniak^[81]分析表明,在不同小黑麦杂交组合的花药培养中,杂种优势较明显。Balatero^[77]分析表明,出愈率和绿苗分化率都遵循加性-显性模型,没有上位性的影响。Schlegel 等^[78]发现,花药出愈率和绿苗分化率呈显著正相关。但截至目前,有关小黑麦不同基因型花药培养效果方面的研究较少。为此,本试验拟利用项目组前期研究的小黑麦花药培养技术,以比较不同小黑麦材料的培养效率,并验证小黑麦花药培养技术的可靠性,为小黑麦单倍体育种奠定基础。

1. 材料与方法

1.1 材料

石河子大学选育的石大 1 号六倍体小黑麦品种,甘肃农业大学草业学院选育的甘农 1 号六倍体小黑麦品种,以及六倍体小黑麦新品系 P4, TZ3, TZ10, TZ12, TZ23, TZ25, TZ26。

1.2 试验设计

将小黑麦新品系 P4, TZ3, TZ10, TZ12, TZ23, TZ25, TZ26, 甘农 1 号小黑麦和石大 1 号小黑麦的幼穗在 4 ℃ 冰箱进行 20 d 幼穗低温预处理,花药接

种于 CHB 培养基中在 28℃ 培养箱中暗培养 30 d，统计愈伤组织数量，再转分化培养基进行分化培养。花药的灭菌，接种，愈伤组织诱导培养，愈伤组织分化培养，无菌苗移植，以及染色体加倍的方法均同于第二章。

1.3 数据分析

花药接种诱导培养基后，统计各小黑麦基因型的胚状体发育状况和愈伤组织诱导率，愈伤组织接种分化培养基后统计绿苗分化率。

愈伤组织诱导率=诱导出愈伤组织的花药个数/总接种的花药个数×100%

绿苗分化率=分化出的绿苗株数/转接的花药愈伤组织的个数×100%

用 SPSS19.0 软件中单因素随机区组试验设计的统计方法，分别分析小黑麦不同基因型的愈伤组织诱导率及绿苗分化率的差异显著性。用 EXCEL 进行数据整理和作图。

2. 结果与分析

2.1 小黑麦不同基因型的花药诱导率效果

如图 3-1 所示，不同小黑麦基因型花药的出愈率不同。TZ26 的花药出愈率 (23.48%) 最高，显著高于其余材料，比居于第 2 位的石大 1 号小黑麦高 151.12%。石大 1 号、TZ25、TZ10 和 P4 的花药出愈率居中，TZ16、TZ23 和 C31 的花药出愈率最低，且无显著差异。

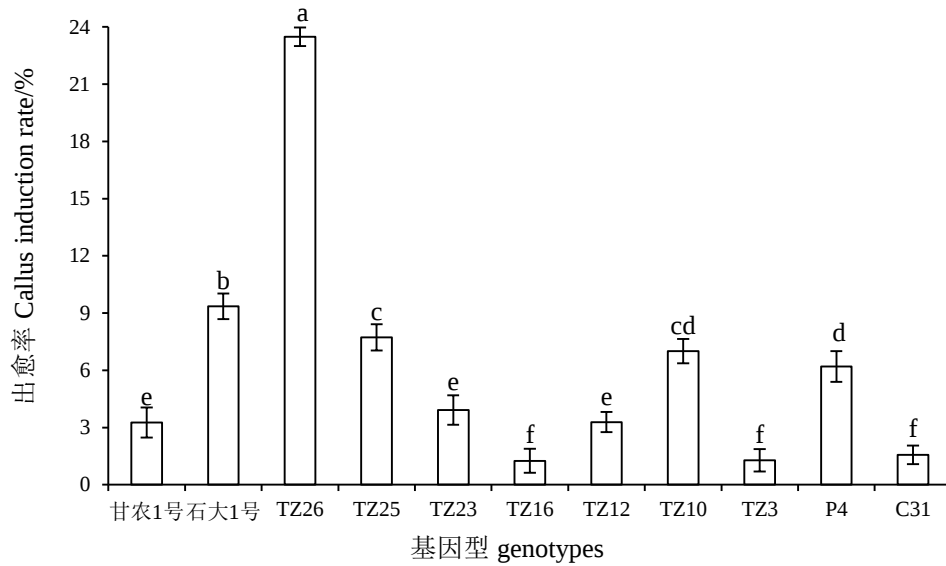


图 3-1 小黑麦不同基因型的花药愈伤组织诱导率

Fig. 3-1 Callus induction rate for different genotypes of triticale

2.2 小黑麦不同基因型的绿苗分化率

小黑麦不同基因型的绿苗分化率不同。TZ26 的绿苗分化率最高，显著高于其余材料，和花药诱导率一致。P4 的绿苗分化率次之，显著高于其余材料。TZ25 绿苗分化率显著显著高于除 TZ26 和 P4 之外的其余材料。TZ23，TZ10，C31 的绿苗分化率居中。石大 1 号小黑麦的绿苗分化率最低。

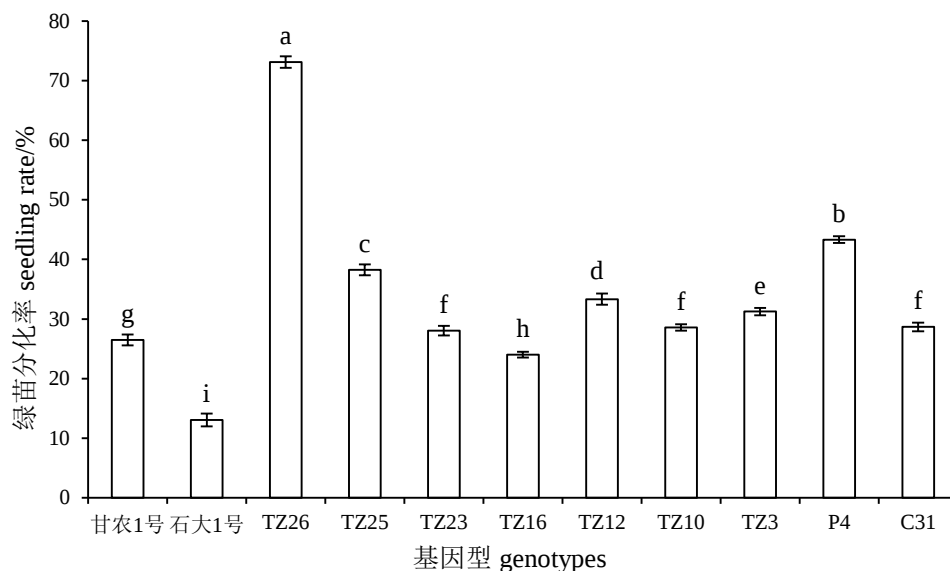


图 3-2 小黑麦不同基因型的绿苗分化率

Fig 3-2 Seedling rate of different genotypes of Triticale

2.3 愈伤组织诱导率和绿苗分化率的相关性

小黑麦材料的胚发育率和成苗率相关性分析（表 1）表明，小黑麦的胚发育率和成苗率呈极显著正相关（ $R=0.97$ ）。

表 3-1 愈伤组织诱导率和绿苗分化率的相关性系数

Table 3-1 Correlation analysis between callus induction rate and seedling rate		
	出愈率 Callus induction rate	绿苗分化率 Seedling rate
出愈率	1	0.76**
Callus induction rate		
绿苗分化率		1
Seedling rate		

3 讨论

据前人研究，植物花药培养力的遗传控制极其复杂，存在各种遗传学效应的可能，表现为多基因控制的数量性状遗传，包括加性效应、胞质效应、显性效应、互作效应、及核质互作效应等^[79-81]。吕学莲等^[71]对 140 份小麦亲本以及其杂种 F1 和 F3 代材料进行花药培养，并对各世代不同基因型的小麦花药培养效果进行研究，发现小麦材料的花药愈伤组织的出愈率、绿苗分化率及绿苗产率因基因型的差异而存在显著差异。将花药培养技术应用于小黑麦育种工作后，可以缩短育种周期，获得稳定遗传性状的植株，但前提是要有花药培养力高、并且具有优良性状的基因型。有的基因型花药培养力高，但其农艺性状表现为株高较低、生物量低、分蘖少和种子产量低等，不能应用于育种，但有些农艺性状好的基因型其花药培养力却较，使花药培养技术得不到应用。所以选择农艺性状好、花药培养力高的基因型是花药培养技术在育种工作中应用的前提。本试验结果表明，不同小黑麦基因型进行花药培养时，愈伤组织出愈率及绿苗分化率均存在差异显著，TZ26 的出愈率及绿苗分化率最高，TZ25 和 P4 的花药培养力次之，并且上述材料的农艺性状较好，可以作为花药培养的亲本材料。尽管石大 1 号小黑麦愈伤组织的诱导率较高，但由于分化的白化苗较多，使其绿苗分化率降低。

花药培养受基因型等因素的影响很大，其在实际生产中的应用受到很大限制，使许多优良基因型丢失。因此，要提高单倍体育种中优良株系的出现频率，还需加强对花药培养技术的优化，亲本选配是花药培养育种的关键环节之一。

4 结论

小黑麦品系 TZ26、TZ25 和 P4 的花药出愈率及绿苗分化率较高，显著高于其余参试材料，可选做花药培养的亲本材料；石大 1 号小黑麦品种的出愈率较高，但绿苗分化率较低。

第四章 小黑麦劣化种质的胚挽救

效果研究

种子的“劣化”或“劣变”是指因种子生存能力降低、导致种子丧失活力和萌发力的不可逆变化，是伴随着种子贮藏时间延长而发生的、不可避免的过程^[82]。在劣化过程中种子内部发生一系列生理生化变化，种子的各种功能和结构受到损害^[83-85]，其损害程度随时间延长而逐渐加剧，从而导致种子质量下降，种子活力和生活力下降，甚至丧失^[86,87]。这主要是因为，虽然胚具有活力，但胚乳丧失了为胚萌发提供营养物质的能力，从而使胚由于缺乏营养而失去活力^[88]。

植物胚是一个具有全能性的多细胞结构，通常能够正常发育成熟，而且可以直接播种形成完整植株。通过离体胚培养，使可能败育或退化的胚获得再生植株，在植物育种中具有十分重要的理论与实践意义^[89,90]。

胚培养可以追溯到 18 世纪，Charles Bonnet 分离并培养了菜豆和荞麦的胚并获得了植株^[91,92]。较为系统的胚挽救技术开始于 20 世纪初，目前胚挽救技术已被广泛地应用于小麦^[93]、大麦^[94,95]、水稻^[96]、茄子^[97]、油菜^[98]、百合^[99]、以及众多果树如桃^[100]、葡萄^[54,101]、樱桃^[102]、苹果^[103]、柿^[104]、李^[105]、柑橘^[106,107]等。Sirikka 等最早进行小黑麦胚挽救技术研究^[108]。目前国内外对小黑麦劣化种子胚挽救技术研究较少。为提高劣化种子的利用率和挽救种质资源，本试验以 10 份澳大利亚小黑麦品种的劣化种子为试材，在体外进行胚培养，以比较各品种的胚发育率、胚萌发率和成苗率，为小黑麦种质资源挽救提供技术支持。

1. 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为引自澳大利亚 10 个小黑麦品种（Cherokee, While M96-3182-1, 33rd ITSN, DH265, AT315, Rhino, AT574, AT528, 32rd ITSN, 2090White）的劣化种子。对照为甘肃农业大学草业学院培育的小黑麦新品系 C24（CK1）和 C31（CK2）的正常种子。

1.2 培养基

1/2MS+2%蔗糖+0.1%麦芽糖+0.5%琼脂, pH 5.8, 于 121℃ 高压灭菌 20 min。

1.3 种子消毒及接种

先将参试材料的种子冲洗干净, 用次氯酸钠消毒 5-10 min, 再用蒸馏水冲洗干净。将冲洗干净的种子浸泡在蒸馏水中, 放置 4℃ 冰箱 24 h。

将浸泡的种子在无菌操作台用次氯酸钠消毒 5-10min, 无菌水冲洗干净并用无菌滤纸将种子干燥。用镊子将种皮剥除, 然后将胚从胚和胚乳连接处切出, 完整的胚盾片向上接种到培养基中。

1.4 培养及转接

将接种好的胚放置于 17℃、光照 16 h、黑暗 8 h 的培养箱中进行培养。当胚发芽至 3 片叶时, 转接到花盆。

1.5 测定指标及方法

接种的胚长出绿芽或根须时为胚发育, 胚发育率为发育胚的个数占接种总胚珠个数的百分比^[109]。计算公式如下,

$$\text{胚发育率 (\%)} = \frac{\text{胚发育数}}{\text{接种胚数}} \times 100\%$$

成苗率为成苗数占接种总胚珠个数的百分比。正常苗为具有正常的根、茎和叶等器官的植株^[109]。计算公式如下,

$$\text{成苗率 (\%)} = \frac{\text{成苗数}}{\text{接种胚数}} \times 100\%$$

1.6 数据分析

用 SPSS19.0 软件中二因素随机区组试验设计的统计方法, 分别分析不同小黑麦材料间、培养时间和品种×培养时间交互作用间胚发育率、胚萌发率和成苗率的差异显著性。如果差异显著, 用 Duncan 法进行多重比较。对小黑麦的胚发

育率和成苗率进行相关性分析。用 Excel 进行数据整理和作图。

2. 结果与分析

由表 4-1 可知，小黑麦材料间，诱导培养天数间以及小黑麦材料间×诱导培养天数交互间的胚发育率和成苗率存在极显著差异 ($P<0.01$)，需进行多重比较。

表 4-1 小黑麦胚发育率和出苗率的方差分析表

Table 4-1 Variance analysis on the embryo development and seedling rate of triticale

指标 index	F 值 F value	
	胚发育率 Embryo development rate	成苗率 Seedling rate
小黑麦材料间 Within triticale materials	18226.120**	7601.246**
诱导培养天数间 Within induction days	1425.977**	5730.690**
小黑麦材料×培养天数间 Triticale materials ×induction days	168.532**	488.340**

2.1 胚发育率

2.1.1 小黑麦材料间胚发育率的差异

参试的 12 份小黑麦材料中，2 对照的胚发育率相近，显著高于其余材料；Cherokee 和 DH265 的胚发育率显著高于其余参试材料；小黑麦材料 2090White、AT528、While M96-3182-1、AT574 和 AT315 的胚发育率依次降低，且有显著差异；33rd ITSN 和 32rd ITSN 和 Rhino 的胚发育率为 0（见表 4-2）。

表 4-2 小黑麦材料间胚发育率和成苗率的差异

Table 4-2 Differences of embryo development and seedling rate for triticale materials

小黑麦材料	指标 index	
Triticale materials	胚发育率 Embryo development rate /%	出苗率 Seedling rate /%
CK1	99.33 a	81.83 a
CK2	98.83 a	82.50 a
Cherokee	86.15 b	57.16 b
DH265	86.56 b	49.00 c
2090White	63.76 c	41.61 d
AT528	61.36 d	41.51 d
AT315	19.01 g	8.23 g
While M96-3182-1	45.13 e	25.11 e
AT574	31.79 f	9.31 f
33rd ITSN	0 h	0 h
32rd ITSN	0 h	0 h
Rhino	0 h	0 h

2.1.2 培养天数间胚发育率的差异

随着培养天数增加，小黑麦胚的发育率逐渐增加。0-7 d 时，小黑麦材料的胚发育率显著低于其他培养天数；7-12 d 时，胚发育率增加较快，增加率为 25.4%；随着诱导培养时间的继续延长，胚发育率增加幅度减缓，27 d 和 32 d 时，胚发育率无显著差异。各培养天数间胚发育率的差异见表 4-3。

表 4-3 诱导培养天数间胚发育率和成苗率的差异

Table 4-3 The difference between days cultured embryo development rate and seedling rate

诱导培养天数 Induction days /d	指标 index	
	胚发育率 Embryo development rate /%	出苗率 Seedling rate /%
7	36.22 e	0 e
12	45.42 d	22.09 d
17	48.70 c	36.93 c
22	53.68 b	43.91 b
27	55.71 a	47.27 a
32	56.24 a	47.93 a

2.1.3 小黑麦材料×培养天数交互作用间胚发育率的差异

如图 4-1 所示, CK1 和 CK2 的胚发育率在诱导培养 12 d 时已经完全发育, 显著高于其余小黑麦材料。随着诱导培养天数增加, 各参试小黑麦材料胚发育率的变化各异: Cherokee 诱导培养 7 d 的胚发育率较低 (57.65%), 随着诱导天数增加, 胚发育率逐渐增加, 但 12 d、17 d、22 d 时增加缓慢, 胚发育率无显著差异, 27 d 时胚发育率显著增加, 32 d 时胚发育率增加缓慢, 无显著差异; DH265 诱导培养 7 d 的胚发育率较高 (83.33%), 胚发育率随着诱导天数的增加而逐渐增加, 7 d、12 d、17 d 时增加的较缓慢, 胚发育率无显著差异, 22 d 时胚发育率显著增加, 27 d 时胚发育率还在增加, 但无差异显著, 32 d 时胚发育率增加不多, 但较 22 d 时显著差异; 2090White 诱导培养 7 d 时, 胚发育率较低 (31.18%), 12 d 时胚发育率增加速度较快, 差异显著, 17 d 时胚发育率显著增加, 22 d 胚发育率比 17 d 时高 56.67%, 差异显著, 随着诱导天数的增加, 胚发育率也在增加, 但 22 d、27 d、35 d 的增加缓慢, 无显著差异; AT528 的胚发育率随着诱导时间的增加而逐渐增加, 但增加的幅度不大, 在诱导培养 7 d 时胚发育率为 56.67%, 12 d 时胚发育率显著增加, 诱导培养 12 d、17 d、22 d、27 d 胚发育率增加缓慢, 无显著差异。诱导培养 35 d 时, 胚发育率和 27 d 无差异显著, 但比 22 d 的胚发育率显著增加; AT315 在诱导培养 7 d 时, 胚发育率较低 (5%), 12 d 胚发育率显著增加, 17 d 胚发育率增加幅度较大, 比 12 d 高 118.95%, 12 d 和 17 d 胚发育率无显著差异, 27 d 胚发育率显著增加, 和 35 d 无显著差异; While M96-3182-1

诱导培养 7 d 时胚发育为 11.76%，随着诱导天数的增加，胚发育率逐渐增加，12 d、17 d、22 d、27 d 胚发育率增加，均有差异显著性，27 d 和 35 d 胚发育率无显著差异。AT574 诱导培养 7 d 时胚发育率为 0，诱导培养 12 d 胚发育率为 25.56%，胚发育率随着诱导天数的增加而缓慢增加，诱导培养 17 d、22 d、27 d 胚发育率显著增加，诱导培养 35 d 胚发育率增加缓慢，无显著差异。

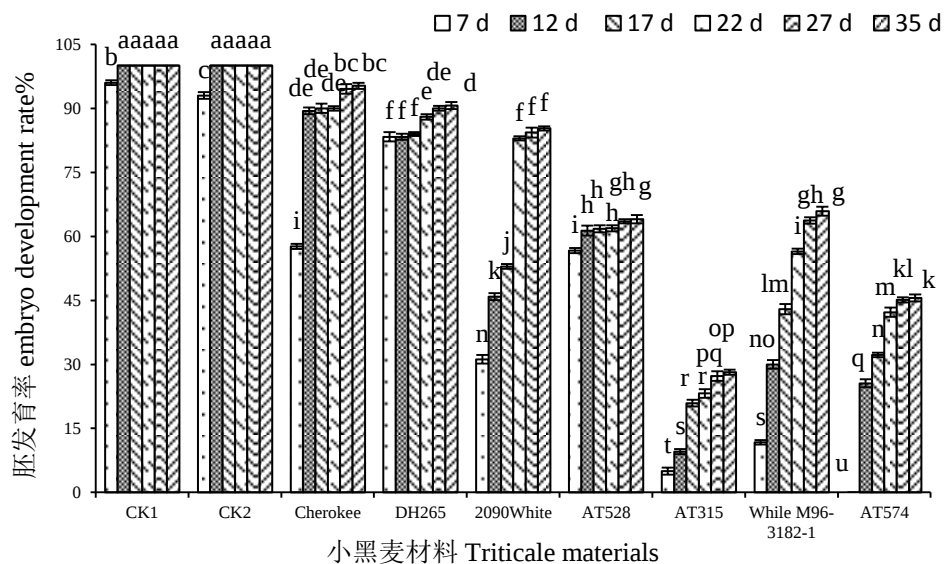


图 4-1 小黑麦材料×培养天数交互作用间胚发育率的差异

Fig 4-1 Triticale materials×days of inducing culture of difference embryo development rate between interaction

注：柱形图间不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同

Notes: Different letters on the columns represent significant difference at the 0.05 level ($P < 0.05$). Same of below

2.2 成苗率

2.2.1 小黑麦材料间成苗率的差异

对照材料的成苗率显著 ($P < 0.05$) 高于其余材料。参试小黑麦材料劣化种子的成苗率为 8.23%-57.16%，Cherokee 的成苗率最高 (57.16%)，显著高于其余参试小黑麦材料；DH265 次之，其成苗率显著高于除 CK1、CK2 和 Cherokee 之外的其他材料；2090White 和 AT528 的胚成苗率相近，居第 3 位；其余材料的胚成苗率较低，其差异显著性见表 2。

2.2.2 诱导培养天数间成苗率的差异

由表 4-3 可知，诱导培养 7 d 时，小黑麦材料的成苗率为 0。随着诱导培养

天数增加，成苗率逐渐增加，除 27 d 和 32 d 间小黑麦材料的成苗率无显著差异外，其余天数间的胚成苗率均有显著 ($P<0.05$) 差异。诱导培养 17 d 时，小黑麦成苗率比 12 d 高 67.18%，22 d 的成苗率比 17 d 高 18.9%，27 d 的成苗率比 22 d 高 7.65%；诱导培养时间 27 d 后，随着培养时间延长，成苗率增加缓慢。

2.2.3 小黑麦材料×培养天数交互作用间成苗率的差异

CK1 和 CK2 在诱导培养 12 d 时已经全部成苗，其成苗率显著 ($P<0.05$) 高于其余小黑麦材料。参试的小黑麦材料在诱导培养 7 d 时成苗率均为 0。Cherokee 诱导培养 12 d 时成苗率较低 (6.47%)，诱导培养 17 d 时成苗率显著增加，增加幅度较大，随着诱导天数的增加，成苗率逐渐增加，但诱导培养 22 d，27 d，35 d 增加缓慢，差异不显著；DH265 在诱导培养 12 d 时成苗率为 0，诱导培养 17 d、22 d 成苗率显著增加，27 d、35 d 成苗率也在增加，但增加的较缓慢，无差异显著性；2090White 的成苗率随着时间的增加而呈匀速增加，诱导培养 12 d、17 d、22 d 成苗率显著增加，27 d、35 d 成苗率增加缓慢，差异不显著；AT528 诱导培养 12 d 的成苗率较高 (40.67%)，17 d 成苗率显著增加，22 d、27 d、35 d 的成苗率增加缓慢，差异不显著；AT315 在诱导培养 12 d 时成苗率为 0，17 d、22 d 成苗率显著增加，27 d、35 d 成苗率无差异显著性；While M96-3182-1 诱导培养 12 d 时成苗率为 6.62%，诱导培养 17 d 成苗率显著增加，高于 241.24%，22 d 时成苗率显著增加，27 d、35 d 成苗率增加缓慢，差异不显著；AT574 诱导培养 12 d、17 d 成苗率为 0，诱导培养 22 d、27 d、35 d 成苗率增加，但无差异显著。

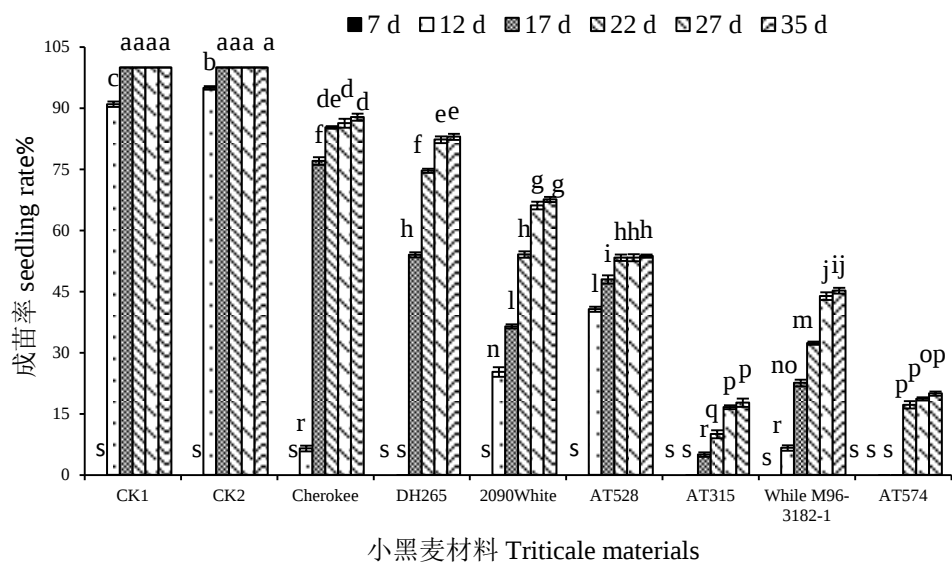


图 4-2 小黑麦材料×培养天数交互作用成苗率的差异

Fig 4-2 Triticale materials×days of inducing culture of difference seedling rate between interaction

2.3 胚发育率和成苗率的相关性分析

小黑麦材料的胚发育率和成苗率相关性分析（表 4-4）表明，小黑麦的胚发育率和成苗率呈极显著正相关（ $R=0.97$ ）。

表 4-4 胚发育率和成苗率的相关性系数

Table 4-4 Correlation analysis between embryo development rate and seedling rate		
	胚发育率 Embryo development rate	成苗率 Seedling rate
胚发育率	1	0.97**
Embryo development rate		
成苗率		1
Seedling rate		

2.4 再生苗移栽的幼苗成活率、株高和叶片数

由表 4-5 可知，对照 CK1 和 CK2 的成活率最高，显著高于其他材料。劣化种子胚的成活率为 9.55%-69.42%，且有显著差异，其中 Cherokee 成活率最高，其次为 DH265，AT315 的成活率最低。对照 CK1 和 CK2 的平均株高最高，显著高于其余参试小黑麦材料。品种 AT528（16.4）平均株高较高，和 CK2 无显著差异，其次为 Cherokee 和 While M96-3182-1，材料 AT574 的平均株高最低。

小黑麦品种 AT528 的平均叶片数最高，显著高于其余参试小黑麦材料；其次为 CK1，Cherokee 和 AT315，3 个品种平均叶片数无显著差异，材料 AT574 的平均叶片数最少，除与 2090White 无显著差异外，显著低于其余参试小黑麦。

表 4-5 小黑麦胚培养再生苗移栽的幼苗成活率、株高和叶片数

Table 5 Survival rate, plant height and the number of leaves for triticale seedlings after embryo rescue

小黑麦材料 Triticale materials	胚珠数 Ovule number/个	成活数 Survival number/株	成活率 Survival rate%	平均株高 Average plant height /cm	平均叶片数 Average blade number
CK1	200	185	92.5 a	16.71 ab	4.58 b
CK2	200	187	93.41 a	17.44 a	4 c
Cherokee	170	118	69.42 b	15.58 c	4.5 b
DH265	150	90	60 c	8.03 f	2.67 f
2090White	170	74	43.53 e	12.8 d	3.43 de
AT528	150	76	50.67 d	16.4 b	5.5 a
AT315	220	21	9.55 g	10.9 e	4.79 b
While M96-3182-1	170	53	31.18 f	15.33 c	3.78 cd
AT574	180	19	10.56 g	4.1 g	3.21 e
33rd ITSN	180	0	0 h	0 h	0 g
32rd ITSN	190	0	0 h	0 h	0 g
Rhino	180	0	0 h	0 h	0 g

3. 讨论

植物的基因型作用对于胚培养来说是一个很重要的因素,不同植物种类或品种胚培养存在很大差异。傅雪琳等^[110]研究发现,成熟稻材料间胚愈伤组织诱导率、质地结构和绿苗再生率有显著差异。王丹菲等^[111]用不同百合品种杂交获得的幼胚为外植体,进行离体胚培养发现,不同杂交组合的胚发育率差异较大。本试验研究结果表明,参试小黑麦材料胚的发育率和成苗率均显著低于正常种子,而且由于劣化种子的劣化程度不同,其发育率和成苗率各异,发育率由高到低依次为: CK2 > CK1 > DH265 > Cherokee > 2090White > AT528 > WhileM96-3182-1 > AT754 > AT315,成苗率依次为: CK2 > CK1 > Cherokee > DH265 > 2090White > AT528 > WhileM96-3182-1 > AT754 > AT315。从而说明 DH265 和 Cherokee 的劣化程度较轻,2090White 和 AT528 居中,其余 3 个材料种子的劣化程度较重,而 33rd ITSN、32rd ITSN 和 Rhino 小黑麦种子已经丧失了活力。

胚培养时间对胚挽救具有重要作用, 张月琴等^[112]研究表明, 小麦成熟胚培养 12 d 左右就可以达到理想的分化效果, 唐冬梅等^[113]研究表明, 无核葡萄不同基因型的胚培养时间不同。本试验结果表明, 随着诱导天数增加, 参试小黑麦材料的胚发育率逐渐增加。诱导培养 7-12 d 时胚发育率和成苗率增加幅度较大, 诱导培养 27 d 和 32 d 时小黑麦材料的胚发育率和成苗率无显著差异, 说明小黑麦胚培养的适宜诱导培养时间为 27 d。

由小黑麦材料×诱导培养天数间的胚发育率和成苗率差异可知, CK1 和 CK2 的胚发育率和成苗率在诱导培养 12 d 时, 均达 100%, 但劣化小黑麦材料种子在诱导培养 27 d 时, 胚发育率仍没有达到 100%, 表明种子劣化对胚萌发有很大影响。参试的每种小黑麦材料的胚发育率和成苗率随着时间的增加而增加, 但增加的速度不同。材料 Cherokee 的胚发育率在 7-12 d 时增加较快, 而 2090White 在 17-22 d 增加快, AT315 和 WhileM96 -3182-1 随着时间的增加呈阶梯式增加, 其余材料的胚发育率显著增加, 但幅度不大。小黑麦材料 2090White 和 AT528 的成苗率在 7-12 d 时增加幅度较大, Cherokee 和 DH265 在 12-17d 时增加快, 其余材料增加匀速增加。赵占军等^[114]研究胚龄对小麦幼胚组织培养效果中表明, 幼胚组织培养最适宜的胚龄为 14-16 d。孙苏阳等^[115]研究表明, 小麦的萌发率和成苗率较高时是较适合幼胚培养的时期, 为胚龄为 16 d。材料 33rd ITSN, 32rd ITSN, Rhino 随着诱导培养时间的增加而无变化, 可能由于其种子劣化时间较长, 而失去活力。

4. 结论

小黑麦材料间胚发育率由高到低依次为: CK2 > CK1 > DH265 > Cherokee > 2090White > AT528 > WhileM96-3182-1 > AT754 > AT315, 成苗率的顺序为: CK2 > CK1 > Cherokee > DH265 > 2090White > AT528 > WhileM96-3182-1 > AT754 > AT315; 小黑麦品种 33rd ITSN、32rd ITSN 和 Rhino 的胚发育率和成苗率均为 0, 完全失活; 小黑麦胚培养的适宜时间为 27 d。

第五章 结论与展望

1 主要结论

1.1 幼穗低温预处理 25 d 时, 参试小黑麦愈伤组织的出愈率最高。花药高温预培养对小黑麦不同基因型愈伤组织出愈率的影响不同。石大 1 号小黑麦的花药在花药高温预培养 2 d 时, 愈伤组织出愈率最高; 小黑麦品系 P4 的花药经花药高温预培养后出愈率反而降低。

1.2 小黑麦品系 TZ26、TZ25 和 P4 的花药出愈率及绿苗分化率较高, 显著高于其余参试材料, 可选做花药培养的亲本材料; 石大 1 号小黑麦品种的出愈率较高, 但绿苗分化率较低。

1.3 劣化小黑麦品种种子胚的发育率和成苗率由高到低分别为: DH265 > Cherokee > 2090White > AT528 > WhileM96-3182-1 > AT754 > AT315 和 Cherokee > DH265 > 2090White > AT528 > WhileM96-3182-1 > AT754 > AT315, 上述材料的胚发育率和成苗率均显著低于正常小黑麦材料 (CK1, CK2); 小黑麦品种 33rd ITSN、32rd ITSN 和 Rhino 的胚发育率和成苗率均为 0; 劣化小黑麦种子进行胚培养时, 诱导培养的适宜时间为 27 d。

2 小黑麦花药培养研究展望

2.1 选择小黑麦花药培养的材料时, 可以选择生育时期相差较大的材料, 或者采用分期播种法, 这样可以有充足材料进行试验

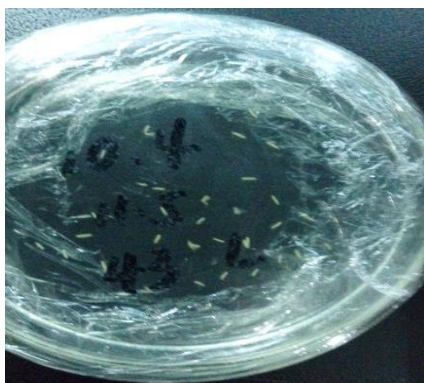
2.2 本试验是在项目组前期研究基础上进行的, 未对花药的诱导培养基及分化培养基进行筛选, 试验过程中发现有的小黑麦材料诱导率和分化率极低。今后试验应对培养基进行进一步筛选。

2.3 本文筛选小黑麦花药培养条件和基因型时, 选用材料的遗传背景较窄。在今后研究中应搜集国内外小黑麦种质资源作为试验材料, 选育更多性状优良并适宜花药培养的材料。

2.4 本试验对小黑麦的老化种子进行胚挽救研究时发现, 3 个小黑麦品种由于种子劣化时间较长而没有萌发。在今后试验中, 可以对培养基进行改良, 以检验种

子劣化时间较长的品种是否完全失活。

试验图片



接种花药



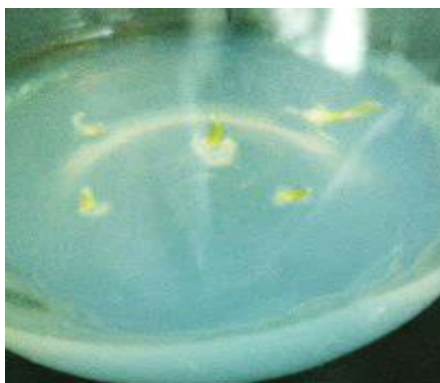
愈伤组织



分化绿苗



转接单倍体植株



劣化胚萌发



劣化胚幼苗

参考文献

- [1] 李冬梅,田新会,杜文华. 5 个小黑麦新品系的种子产量及产量构成因素分析[J]. 草地学报,2016,(01):241-244.
- [2] 赵雅姣,田新会,杜文华. 饲草型小黑麦在定西地区的最佳刈割期[J]. 草业科学,2015,(07):1143-1149.
- [3] 宋慧欣,周春江,侯福强,等. 饲草小黑麦优质高产栽培技术研究[J]. 作物杂志,2004,(03):22-25.
- [4] 朱铁霞,高凯,王国成. 小黑麦研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版),2011,(04):433-437.
- [5] 李冬梅. 饲草型小黑麦的遗传图谱构建及草产量和抗锈病相关基因的 QTL 定位[D]. 甘肃农业大学,2016.
- [6] 刘宁涛. 小麦花药培养效率改进和基因型筛选研究[D]. 中国农业科学院,2013.
- [7] T Tulecke. The pollen of *Gingko biloba*-in vitro culture and tissue formation[J]. American Journal of Botany, 1957,44(07): 602-608.
- [8] Marciniak,Kacmarek,Adamski,et al.The anther-culture response of triticale line $\times$ tester progenies [J].Cellular &Molecular Biology Letters ,2003,8(2):343-351.
- [9] 朱至清,王敬驹,孙敬三,等. 通过氮源比较试验建立一种较好的水稻花药培养基[J]. 中国科学,1975,(05):484-490.
- [10] 倪胜利,李唯,李胜,等. 影响旱作小麦高效花药培养的因素[J]. 甘肃农业大学学报,2004,(02):141-145.
- [11] 王延玲,丰震,赵兰勇. 植物花药培养研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2006,(01):149-151.
- [12] 刘鸿艳,郑成木. 花药培养育种研究进展[J]. 热带农业科学,2001,(01):61-64+74.
- [13] 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,(07):1209-1215.
- [14] 武晓红,刘孟军,赵习平. 基因型和植物生长调节剂对枣花药培养的影响[J]. 江西农业学报,2015,(06):37-39.
- [15] 曹禹,李鹏飞,甘玲玉,等. 冬性小黑麦花药培养的基因型和培养基效应的研究[J]. 新疆农业科学,2007,(S3):97-100.
- [16] 蔡正云,吕学莲,白海波,等. 基因型对小麦花药培养的影响研究[J]. 广东农业科学,2014,(24):1-5.
- [17] 华为,尚毅,贾巧君,等. 大麦花药快速培养法及不同基因型对花药培养的影响[J]. 浙江农业学报,2013,(03):425-430.
- [18] 贺苗苗. 不同基因型马铃薯的花药培养研究[J]. 江苏农业科学,2014,(09):90-91.
- [19] 苗立新,李鑫,崔薇薇,等. 北方粳稻花药培养力及配合力分析[J]. 辽宁农业科学,2013,(01):9-12.
- [20] 李胜, 李唯.植物组织培养原理与技术[M].北京:化学工业出版社,2007,10.
- [21] 李梅,官春云,陈社元,等. 油菜小孢子培养和双单倍体育种研究 II .影响甘蓝型油菜和芥菜型油菜种间杂种胚产量的因素[J]. 作物学报,2003,(05):744-749+804.
- [22] 谢淼,秦丽颖,潘俊松,等. 黄瓜花器形态发生、小孢子发育与花药培养[J]. 西北植物学报,2005,(06):1096-1100.
- [23] 李允菲,王仁涛,袁存权,等. 红花槐花药培养最适取材时期及选蕾标准[J]. 西北农林科技

- 大学学报(自然科学版),2013,(08):65-71.
- [24] 曹鸣庆,李岩,刘凡. 基因型和供体植株生长环境对大白菜游离小孢子胚胎发生的影响[J]. 华北农学报,1993,(04):1-6.
- [25] 欧阳西荣,罗杰·博伊德. 大麦供体植株生长环境条件对花药培养的影响[J]. 湖南农业大学学报,1995,(04):348+342-348.
- [26] Nitsch;Norreel. Factors favoring the formation of androgenetic embryos in anther culture[J]. Basic Life Sci, 1973(02): 129-144.
- [27] 张春芬. 小孢子发育时期与低温预处理对苹果花药培养胚状体形成的影响[A]. 中国园艺学会.中国园艺学会 2013 年学术年会论文摘要集[C].中国园艺学会:,2013:1.
- [28] 袁惠燕,侯喜林. 温度预处理对不结球白菜杂种 F₁ 花药培养的影响[J]. 南京农业大学学报,2008,(04):144-148.
- [29] 吕学莲,白海波,董建力,等. 培养基及高温暗培养时间对小麦花药培养的影响[J]. 种子,2015,(06):84-87.
- [30] 蒋武生. 甘蓝花药培养和游离小孢子培养效果比较[A]. 中国园艺学会.中国园艺学会 2015 年学术年会论文摘要集[C].中国园艺学会:2015:1.
- [31] 吴丁,赵友谅,和欢昌,等. 花药培养新技术在冬小麦育种上的应用[J]. 河南科技,1983,(07):1-3+7.
- [32] 葛胜娟. 水稻花药培养及其在遗传育种上的应用[J]. 种子,2013,(09):47-50.
- [33] 郭奕明,杨映根,郭仲琛. 玉米花药培养和单倍体育种的研究新进展[J]. 植物学通报,2001,(01):23-30+39.
- [34] 原玉香,蒋武生,张晓伟,等. 人工合成甘蓝型油菜的花药培养[J]. 河南农业大学学报,2004,(04):414-416+422.
- [35] 宋金龙,裴红霞. 胡萝卜花药培养的研究进展[J]. 农业技术与装备,2010,(24):4-6.
- [36] 范适,刘志敏,连勇. 茄子小孢子培养及其在育种中的应用[J]. 湖南生态科学学报,2014,(04):50-54.
- [37] 斯华敏,傅亚萍,肖晗,等. 转基因水稻经花药培养获得纯系的研究[J]. 中国水稻科学,1999,(01):19-24.
- [38] 朱丽,傅亚萍,刘文真,等. 利用共转化和花药培养技术快速获得无选择标记的三价转基因水稻[J]. 中国水稻科学,2007,(05):475-481.
- [39] Soller, Beckman. Marker-based mapping of quantitative trait loci using replicated progenies[J]. Theor.Appl. Genet, 1990, 80(2): 205-208.
- [40] Li, Hearne, Bänziger, *et al.* Statistical properties of QTL linkage mapping in biparental genetic populations[J]. Heredity, 2010, 105(3): 257-267.
- [41] 景蕊莲, 吕小平, 贾继增,等. 用花药培养创建小麦加倍单倍体作图群体[J]. 生物技术, 1999, 9(3):4-8.
- [42] Nguyen. 一个籼粳交加倍单倍体群体的构建与分析[D]. 浙江大学, 2016.
- [43] 汪军妹, 沈秋泉, 杨建明,等. 大麦加倍单倍体(DH 群体)的建立及其在遗传育种中的应用[J]. 大麦与谷类科学, 2002(1):10-13.
- [44] 朱惠琴, 戴文新. 烟草加倍单倍体群体的构建及其在遗传育种中的应用[J]. 青海大学学报, 2003, 21(6):20-23.
- [45] Fernandez, Figueiras, Benito. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104(5): 845-851.
- [46] 蒋迪军,牛建新,刘红. 草莓小孢子细胞学发育时期与花器形态相关性研究[J]. 石河子大

- 学学报(自然科学版),1997,(04):21-26.
- [47] G.E. Hanning,B.V. Conger. Factors influencing somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *dactylis glomerata*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1986,123(01): 23-29.
- [48] Laibach S,Wiesener K,Franke R. Oxygen electrodes for electrochemical syntheses in aggressive media[J]. *Chemie Ingenieur Technik*, 1998,70(04): 444-448.
- [49] 贺涛,苏丹萍,李薇,等. 植物种子胚培养研究进展[C].广东省植物学会 2012 年年会. 2012.
- [50] 祁业凤,刘孟军. 枣胚培养影响因素研究[J]. *果树学报*,2004,(01):25-28.
- [51] 刘三军,蒯传化,于巧丽,等. 葡萄无核性状遗传与胚挽救技术的研究及应用[J]. *果树学报*, 2009,(01):71-76.
- [52] 刘佳,刘晓,陈建,等. 金星无核葡萄胚挽救影响因素的研究[J]. *西南农业学报*,2013, (01):294-298.
- [53] 张满让,韩明玉,王西玲,等. 影响早熟油桃胚培养的几个因子[J]. *果树学报*,2004,(04):382-384.
- [54] 潘春云,亓桂梅,汤小宁,等. 葡萄三倍体育种初报[J]. *山东农业大学学报*,1998,(03): 25-28.
- [55] 李世诚,金佩芳,蒋爱丽,等. 与四倍体杂交的无核葡萄胚珠培养获得三倍体植株[J]. *上海农业学报*,1998,(04):13-17.
- [56] 申书兴. 植物倍性间杂种胚败育的原因及克服方法[J]. *农牧情报研究*, 1989(7):23-28.
- [57] 闫爱玲,张国军,徐海英. 葡萄多倍体育种研究进展[C].中国园艺学会青年学术讨论会. 2006.
- [58] 李霞,白雅梅,李文霞,等. 温度预处理对二倍体马铃薯花药培养诱导愈伤的影响[J]. *中国马铃薯*,2009,(02):65-67.
- [59] 张跃非,李碧如. 温度在水稻花药培养过程中的影响研究[J]. *吉林农业*,2010,(11):68+76.
- [60] 庄军平,巩振辉,苏菁. 温度对辣椒花药愈伤组织形成的影响[J]. *西北农业学报*,2001,(02):49-51.
- [61] 曾君祉,欧阳俊闻. 在常温和低温条件下离体培养的小麦花药中小孢子的早期发育[J]. *遗传学报*,1980,(02):165-173+211-212.
- [62] Nitsch, Nitsch .aploid plants fr om polleng rains[J] .*Science* , 1969, 163:85-87.
- [63] 李春红,胡道芬,郭仲琛. 低温处理对玉米花药培养的影响[J]. *植物学通报*,1992, (04):41-43.
- [64] 黄斌. 大麦花药培养中低温预处理对花粉愈伤组织形成的影响[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*,1985,(04):439-443.
- [65] 渠荣达,陈英.低温预处理提高水稻花粉愈伤组织诱导频率的作用(初报)[J]. *植物生理学报*,1983,(04):375-381.
- [66] 陈春艳,刘仁祥,雷红梅,等.低温预处理对烟草花药培养诱导率的影响[J]. *贵州农业科学*,2010,(05):16-18.
- [67] 宋运贤,周素英,杜雪玲,等.低温预处理对小麦花药内源激素的影响[J]. *核农学报*,2012,(07):1064-1069.
- [68] 孙娜.小黑麦花药培养体系的建立及培养力的遗传模式分析[D].石河子大学,2009.
- [69] 张跃非,王金玲,邓晓容. 高温热击处理对培养水稻花药愈伤组织形成的影响[J]. *绵阳师范学院学报*,2010,(11):81-84.
- [70] 胡冬梅. 影响小麦花药愈伤组织诱导和植株再生的因素[J]. *青海农林科技*,2000, (04):11-12.

- [71] 吕学莲,白海波,蔡正云,等. 小麦花药培养的基因型效应及优良基因型筛选[J]. 中国农学通报,2011,(33):13-17.
- [72] 孙敬三,朱至清,王敬驹,等. 小黑麦花药培养的研究[J]. Journal of Integrative Plant Biology,1980,(01):27-31.
- [73] 唐选明,郑企成. 小黑麦原生质体的植株再生[J]. 核农学通报,1991,(06):257-259.
- [74] 魏凌基,孔广超,艾尼瓦尔. 蔗糖对小黑麦离体培养穗粒数的调节作用[J]. 种子,2003,(02):9-10.
- [75] 柴守玺,Kleijer Gert. 赤霉菌含毒素代谢物对小黑麦愈伤组织和胚芽生长的影响[J]. 草业学报,2001,(01):78-85.
- [76] 孙娜,石培春,魏凌基,等. 冬春性小黑麦花药愈伤组织诱导的影响因素[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2009,(01):1-5.
- [77] Balatero,Darvey,Luckett.Genetic analysis of anther-culture response in $6 \times$ triticales [J].Theoretical and Applied Genetics ,1995,90 :279-284.
- [78] Schlegel,Belchev,Kostov.In heritanc of high anther culture response in hexaploid wheat,Tritium aestivnm L.var.Svilena.Bulgarian[J].Journal of Agricultural Science,2000, 6:261-270.
- [79] Torp, Hansen, Andersen. Chromosomal regions associated with green plant regeneration in wheat (*Triticumaes-tivum* L.) anther culture[J]. Euphytica,2001,119:377-387.
- [80] 王羽,樊庆琦,张利,等. 小麦花药培养特性的数量遗传分析[J]. 麦类作物学报,2007,(05):755-760.
- [81] 叶兴国,徐惠君,徐琼芳,等. 小麦花药培养力的基因型差异和配合力分析[J]. 中国农业科学,1997,(06):50-55.
- [82] Anderson.Metabolic changes as sociated with sence[J].Seed Science and Technology, 1973,1:401 - 416.
- [83] 董新红,宋明. 种子劣变的原因及其防止与修复[J]. 中国种业,2002,(01):39-40.
- [84] 王彦荣,刘友良,沈益新.种子劣变的生理学研究进展综述[J].草地学报,2001,(03):159-164.
- [85] 李青丰,易津,房丽宁,等.种子的劣变及劣变原因的研究[J].内蒙古农牧学院学报,1996,(02):59-65.
- [86] 韩建国,浦心春,毛培胜.高羊茅种子老化过程中酶活性的变化[J].草地学报,1998, (02):84-89.
- [87] 陈润政,周晓强,傅家瑞.不同贮藏湿度对红麻种子活力一些生理生化变化的影响[J].种子, 1989,(03):5-7+13.
- [88] Bhalt acharrya,Hazra,Sen Mandi.Accelerated aging of seeds in hot water: germination characteristic- ccs of aged wheat seeds[J].Seed science and technology,1985,13 (3):683-690.
- [89] Gray,Fi sher,Mortensen.Comparison of methodologies for in ovule embryo rescue of seedless grapes[J].Hort Science,1987,22(6):1334 -1335 .
- [90] Gray,Mortensen, Betten.Ovule culture to obtain progeny from hybrid seedless bunch grapes[J].J Amer Soc Hort Sci,1990 ,115(6):1019 -1024.
- [91] 陈香波,曹孜义. 离体葡萄未成熟胚成苗途径研究[J]. 果树科学,2000,(04):261-264.
- [92] 董晓玲. 无核葡萄杨格尔的胚发育及胚珠培养[A]. 葡萄研究论文选集[C],2003,(03):39-41.
- [93] 邓光兵,马欣荣,张小萍,等. Phlb 基因在普通小麦与簇毛麦杂种 F₁ 中的作用[J]. 应用与环境生物学报,1998,(03):211-215+311.
- [94] 李璋,刘翠云,阎正录,等. 普通小麦×栽培大麦杂种植株及其回交后代的产生和鉴定[J].

- 遗传学报, 1987,(03):188-192+244.
- [95] Xia G M , Xiang F N, Zhou A F. Asymmetric somatic hybridization between wheat (*Triticum aestivum* L.) and *Agropyron elongatum* (Host) Nevishi [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 299-305 .
- [96] 迟全勃, Prapa Sripichitt, 许红春. 通过胚胎拯救将野生稻耐旱特性转移到栽培稻进行远缘杂交初探[J]. *中国农学通报*, 2005, (10): 368-372.
- [97] Buitendijk, Pinsonneaux. Embryo rescue by half ovule culture for the production of interspecific hybrids in *Alstroemeria* [J]. *Scientia Horticulturae*, 1995, 64: 65-75 .
- [98] 王爱云, 李梅, 胡大有. 生物技术在油菜种质创新中的应用[J]. *生命科学研究*, 2006, (01): 18-23.
- [99] 杨利平, 丁冰. 百合种间远缘杂交种的育成[J]. *河北林果研究*, 1998, (03): 16-20.
- [100] 庄恩及, 姚强, 吴钰良, 等. 早熟和特早熟桃胚珠培养研究[J]. *园艺学报*, 1991, (04): 303-308.
- [101] 徐海英, 阎爱玲, 张国军. 葡萄二倍体与四倍体材料间杂交胚珠的离体培养[J]. *果树学报*, 2001, (06): 317-320.
- [102] Mu, Lena. Rescue of hybrid embryos of *Actinidia* species [J]. *Scientia Horticulturae*, 1990, 44 : 97 -10 .
- [103] Ramming. The use of embryos culture in fruit breeding [J]. *Hort-Science*, 1990, 25(4): 393 -398 .
- [104] 谷晓峰, 唐仙英, 罗正荣. 罗田甜柿幼胚培养条件的研究[J]. *果树学报*, 2001, (02): 80-83.
- [105] 刘用生, 殷桂琴, 汪涛. GA、6-BA、IBA 与活性炭对李胚萌发及幼苗生长影响[J]. *植物生理学通讯*, 1993, (01): 32-34.
- [106] 裘文达. 园艺植物组织培养[M]. 上海: 上海科技出版社, 1986 : 195 -197.
- [107] 伊华林, 邓秀新. 培养三倍体柑桔植株的研究[J]. *果树科学*, 1998, (03): 212-216.
- [108] Fan Chuanshu, Ma Yuansheng. Rescue and Characterization of Aged Seeds by Embryoculture [C]. *Biotechnology in Agriculture*, 1993, (15): 296-299.
- [109] 王爱玲, 王跃进, 唐冬梅, 等. 提高无核葡萄胚挽救中幼胚成苗率的研究[J]. *中国农业科学*, 2010, (20): 4238-4245.
- [110] 傅雪琳, 卢永根, 刘向东, 等. 几个水稻粳型亲粳系成熟胚离体培养研究初报[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2006, (03): 230-234.
- [111] 王丹菲, 代汉萍, 雷家军. 百合种间杂种胚离体培养研究[J]. *北方园艺*, 2006, (04): 157-159.
- [112] 张月琴, 陈耀锋, 王丽, 等. 小麦成熟胚培养条件的优化及高效基因型筛选[J]. *干旱地区农业研究*, 2014, (05): 100-105.
- [113] 唐冬梅, 蔡军社, 骆强伟, 等. 用于无核葡萄选育的胚挽救技术研究[J]. *果树学报*, 2008, (03): 316-321.
- [114] 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, (05): 7-8.
- [115] 孙苏阳, 王永军, 李海军, 等. 胚龄、激素对小麦单倍体萌发率及成苗率的影响[J]. *江苏农业学报*, 2013, (03): 679-681.

致 谢

时光飞逝，三年的硕士研究生生涯即将要画上句号。回想研一刚入学时的情形还历历在目。在这三年的学习、生活期间，有许多的老师、同学以及亲人给予了我太多的帮助和支持，同时，也感谢我的母校甘肃农业大学，在这里我不但得到了继续深造的机会，也学到了甘农学子“勤奋严谨 求实创新”的校风和“诚朴博学 慎思敏行”的学风。

首先，感谢的是我的恩师杜文华教授。在这三年研究生生涯期间，杜老师为我提供和创造了良好的学习环境，每周都会利用自己空闲和休息的时间，为我在小论文撰写、试验设计、学位论文的定题、撰写、修改等方面进行悉心的指导和帮助。她在平时对学术方面的严谨和认真，对学生的关怀、帮助和宽容、对工作的敬业，让我不仅从杜老师的身上学到了专业知识和对学术的一丝不苟，同时还学诚实做人的态度，使我受益匪浅。这些感激之情是我无法用言语所能表达的。

其次，感谢临洮县农校的孙会东老师。我们在临洮农校农场进行小黑麦大田试验种植期间，孙老师总是平时帮助我们管理田间作物，为我们试验能够顺利进行提供了莫大的帮助。在此，对孙老师表示我最崇高的敬意。

另外，感谢甘肃农业大学草业学院的陈建钢和蔡卓山两位老师，两位老师在我做实验期间尽我所能的为我提供实验器材和实验场地，同时还教会我许多实验仪器的使用和操作，并且能及时维修实验仪器，是这两位老师无私的奉献和帮助，才使我的实验能够顺利完成。在这里，表示我最诚挚的感激。

再次，感谢我的师兄师姐师弟师妹，还有舍友，他们在我遇到问题是能够及时帮助和鼓励我，有了他们，使我的研究生生活变得快乐。他们每个人都是我学习的榜样。这里，表示对他们由衷的感谢。

同时，特别感谢我的家人，是他们对我的鼓励和帮助，才使我能够顺利的完成学业。对他们表示由衷的感谢！

最后，感谢各位专家评委对我的论文提出批评和建议！向关心、帮助和支持过我的所有老师、领导、同学以及亲人们表示由衷的感谢！

李 雪

2017 年于甘肃农业大学

导师简介

杜文华，女，博导，教授，甘肃临洮人。1991 年毕业于甘肃农业大学农学系，1991~1998 年在甘肃省农科院从事作物育种、栽培方面的研究工作。2002 年获农学硕士学位，2005 年获农学博士学位。2006.4~2009.4 在兰州大学生物学博士后流动站做博士后。2009.8~2010.8 在澳大利亚悉尼大学做访问学者。2009 年入选甘肃省领军人才第二层次人选。2002 年 7 月至今，在甘肃农业大学草业学院工作，主要从事牧草育种、栽培及种质资源方面的教学及研究工作。

主持和参与完成国家级和省级科研项目 10 项，获得甘肃省科技进步二等奖 1 项，三等奖 1 项；高校科技进步二等奖 1 项，甘肃省农牧渔业丰收一等奖 2 项，二等奖 1 项。

主编《红三叶》和《猫尾草种质资源描述规范和数据标准》，参编《优良苜蓿品种及栽培关键技术》、《草坪草种子生产技术手册》和《退耕还草技术指南》等专著。发表论文 60 余篇，SCI 收录 6 篇。

作者简介

李雪，女，1992 年生，黑龙江肇东人。2014 年毕业于天津农学院林学院林学专业，获得农学学士学位；2014 年 9 月-2017 年 6 月在甘肃农业大学草业学院攻读硕士学位，硕士阶段的研究方向为草种质资源及育种栽培，主要从事小黑麦种质资源多样性及栽培育种的研究。研究生期间以第一作者发表的论文如下：

[1]李雪,田新会,杜文华. 饲草型小黑麦苗期抗旱指标的筛选 [J]. 草业科学, 已见刊。

[2] 李雪,田新会,杜文华.不同小黑麦基因型的胚挽救效果研究 [J].草原与草坪, 已录用。

原创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得甘肃农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：李雪

签字日期 2017 年 5 月 24 日

学位论文版权认定和使用授权书

本人完全了解甘肃农业大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保存并向国家有关部门或机构送交论文的纸质版和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权甘肃农业大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用任何复制手段保存和汇编本学位论文。本人离校后发表、使用论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，第一作者及通讯作者署名单位为甘肃农业大学。

保密的学位论文在解密后遵守此规定。

学位论文作者签名：李雪

导师签名：李海

签字日期：2017 年 5 月 24 日

签字日期：2017 年 5 月 25 日