

刘建新, 吴立成, 王冠, 等. 黑龙江省一、二积温区水稻花药培养条件优化[J]. 黑龙江农业科学, 2019(8):9-14.

# 黑龙江省一、二积温区水稻花药培养条件优化

刘建新<sup>1,2</sup>, 吴立成<sup>2,3</sup>, 王冠<sup>4</sup>, 李希臣<sup>1,2</sup>, 李焱<sup>1,2</sup>, 刘明<sup>1,2</sup>, 刘森<sup>1,2</sup>, 王玲<sup>1,2</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院 耕作栽培研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省作物分子设计与种质创新重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 黑龙江省农业科学院 生物技术研究, 黑龙江 哈尔滨 150086; 4. 黑龙江省农业科学院 黑龙江农业科技杂志社, 黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**为提高黑龙江省第一、二积温带水稻花药培养效率, 促进该技术在粳稻新品种选育中的应用, 以五优稻2号及黑龙江省第一、二积温区骨干亲本的F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>为材料, 对提高花培效率的几个关键环节如取材标准、关键时期培养基配方和培养条件等进行了方法改良。结果表明: 取穗以叶枕距、颖壳颜色和花药长度等多重因素为标准; 适用于以五优稻2号为亲本的诱导培养基配方为进口N<sub>6</sub>+凝胶3.6 g·L<sup>-1</sup>+蔗糖60 g·L<sup>-1</sup>+2,4-D 2 mg·L<sup>-1</sup>; 分化培养基配方为MS+KT 2 mg·L<sup>-1</sup>+IAA 1 mg·L<sup>-1</sup>+蔗糖30 g·L<sup>-1</sup>+琼脂4 g·L<sup>-1</sup>, 同时辅以16 h光照; 生根培养基中加入3~6 mg·L<sup>-1</sup>多效唑, 可以壮苗促分蘖, 提高移栽成活率。

**关键词:** 水稻; 花药培养效率; 条件优化

在水稻细胞工程育种中, 水稻花药培养作为一项高效、实用、成熟的育种新技术, 能有效缩短育种周期、提高选择效率, 加速有效性状转移, 在水稻新品种选育、种质资源创新、籼粳远缘杂种优势利用及水稻基因工程育种等方面越来越广泛<sup>[1]</sup>。黑龙江省水稻花药培养始于20世纪70年代, 尤以黑龙江省水稻研究所(原黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所)领先, 以龙粳31为首, 培育出了多个花药培养品种。然而该技术在黑龙江省第一、二积温带应用的并不广泛, 除了育种者们对花培育种优越性的认识不够, 该技术工作量大、技术要求严格和效率低等也是制约其发展应用的主要因素。第一、二积温区是高产优质水稻的主要种植区域, 开展水稻花培育种工作与常规育种相结合, 创制优质、高产、多抗性的水稻新种质, 对

不断创新和完善寒地早粳育种技术体系, 选育推广突破性水稻新品种意义重大。

本课题组自2015年开始以黑龙江省第一、二积温带的主要水稻育种资源为材料进行花培工作, 至2017年获得了较大的突破性进展。从2015-2017年, 接种组合数逐年提高, 2015年仅接种3个组合作为初始的试验对象, 同时还以当地优势品种五优稻2号作为基础材料对花药培养过程中愈伤诱导的条件进行了摸索。2016年接种组合有所增加, 愈伤诱导率也略有提高, 达到15.53%。2017年, 由于大幅度的扩大了接种组合数, 组合亲本材料涉及到了将近200份资源或中间材料, 加之培养条件的限制, 平均愈伤诱导率为13.71%。

表1 2015-2017年花药培养概况  
Table 1 Overview of anther culture during 2015-2017

年份 Year	接种组合数 No. of groups	平均愈伤诱导率 Callus reduction rate/%	平均分化率 Regeneration rate/%	移栽成活率 Transplantation survival rate/%	收获花培后代数 Diploid seeds
2015	3	12.23	2.73	34.49	11
2016	6	15.53	2.36	44.20	23
2017	141	13.71	17.99	70.47	979

2015年和2016年平均分化率分别为2.73%和2.36%, 移栽成活率分别为34.49%和44.20%, 而经过对培养条件的优化, 2017年平均分化率达到17.99%, 移栽成活率达到70.47%。并且2017年收获了70个组合的DH群体, 包括

收稿日期: 2019-03-15  
基金项目: 黑龙江省农业科技创新工程院级重点项目(2014ZD032); 黑龙江省应用技术与开发计划重大项目(GA18B101)。  
第一作者简介: 刘建新(1976-), 女, 博士, 助理研究员, 从事分子生物学研究。E-mail: wendyliujx@163.com。

979 份种子。其中已知亲本组合 60 个,涉及到的亲本多达 81 个。这一系列的进展源于对水稻花药培养各环节的优化,包括对取穗时期判断多重标准的确定、灭菌环节方法的改进、接种工人管理措施、接种方法改进、诱导、分化、生根培养基配方的改良和移栽前后管理方法的改进等。本文对提高花培效率的几个关键环节进行的方法改良试验,旨在建立广谱、稳定、高效的花药培养技术体系,以促进该技术在黑龙江省粳稻新品种选育中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 本试验所用材料均为黑龙江省第一、二积温带主要育种单位配制的杂交组合 F<sub>1</sub> 和 F<sub>2</sub>,以及优良育种亲本五优稻 2 号。

1.1.2 试剂 本试验所用试剂中,常规试剂均为国药生产,激素类药品为 Sigma 公司生产,进口 MS 和 N<sub>6</sub> 培养基为 Duchefa 公司生产,国产 N<sub>6</sub> 培养基为海博生物公司生产。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 试验材料于每年 7 月取材于各地水稻田,包括黑龙江省农业科学院黑龙江省现代农业示范区水田、五常水稻所水田和绥化分院水田等。试验完成于黑龙江省农业科学院作物分子设计与种质创新重点实验室。诱导培养基配方优化试验材料为五优稻 2 号,分化培养基优化试验材料为杂交组合(绥粳 4 号×东农 418)的 F<sub>2</sub> 产生的愈伤组织,生根培养基优化试验材料为杂交组合(龙粳 51×特早香)的 F<sub>1</sub> 产生的花培苗。

1.2.2 花药镜检 2015 年 7 月末取种植在田间处于孕穗期的五优稻 2 号水稻幼穗,按照叶枕距离 5、6 和 7 cm(穗未抽出)进行取穗,带倒二叶,取回实验室后抽出稻穗,取中段的花药 1~2 粒,放在载玻片上,滴一滴无菌水,盖上盖玻片,轻轻用橡皮敲打至花药壁破碎,在显微镜下观察花粉大孢子母细胞的显微结构。每个叶枕距长度取 5 穗,每穗取 5~10 粒花药。

1.2.3 愈伤诱导培养基优化 以五优稻 2 号为材料,将取回的稻穗酒精擦拭后,用纱布和保鲜膜包裹保湿,放入 5~7℃ 冰箱中低温处理 5~7 d,无菌环境下抽出稻穗,去掉上部颖壳已经变绿发硬的部分和穗下部嫩黄发软的部分,进行灭菌处理。首先在 70% 酒精中灭菌 2 min,取出后浸入

0.1% 的升汞溶液中 15~20 min,之后无菌水冲洗 3 遍,用滤纸吸干稻穗上的水分,放入无菌容器中,即可开始接种。每个配方培养基 5 次重复,每瓶接种 150 个花药。诱导培养基配方如表 2。接种后的材料放入 28℃ 的恒温环境中暗培养,20 d 后将长出的愈伤组织挑出,转入分化培养基中。计算愈伤组织诱导率,诱导率(%)=愈伤数/花药数×100。

表 2 水稻花药培养诱导培养基配方  
Table 2 Induction media formula of anther culture of rice

编号 No.	诱导培养基配方 Induction media formula
1	N <sub>6</sub> (Duchefa)+琼脂 5 g·L <sup>-1</sup> +蔗糖 30 g·L <sup>-1</sup> +2,4-D 2 mg·L <sup>-1</sup>
2	N <sub>6</sub> (Duchefa)+琼脂 5 g·L <sup>-1</sup> +蔗糖 60 g·L <sup>-1</sup> +2,4-D 2 mg·L <sup>-1</sup> +KT 2 mg·L <sup>-1</sup>
3	N <sub>6</sub> (Duchefa)+凝胶 3.6 g·L <sup>-1</sup> +蔗糖 30 g·L <sup>-1</sup> +2,4-D 2 mg·L <sup>-1</sup> +KT 2 mg·L <sup>-1</sup>
4	N <sub>6</sub> (Duchefa)+凝胶 3.6 g·L <sup>-1</sup> +蔗糖 60 g·L <sup>-1</sup> +2,4-D 2 mg·L <sup>-1</sup>
5	N <sub>6</sub> (海博)+琼脂 5 g·L <sup>-1</sup> +蔗糖 60 g·L <sup>-1</sup> +2,4-D 2 mg·L <sup>-1</sup>
6	N <sub>6</sub> (海博)+琼脂 5 g·L <sup>-1</sup> +蔗糖 30 g·L <sup>-1</sup> +2,4-D 2 mg·L <sup>-1</sup> +KT 2 mg·L <sup>-1</sup>
7	N <sub>6</sub> (海博)+凝胶 3.6 g·L <sup>-1</sup> +蔗糖 30 g·L <sup>-1</sup> +2,4-D 2 mg·L <sup>-1</sup> +KT 2 mg·L <sup>-1</sup>
8	N <sub>6</sub> (海博)+凝胶 3.6 g·L <sup>-1</sup> +蔗糖 60 g·L <sup>-1</sup> +2,4-D 2 mg·L <sup>-1</sup>
对照	N <sub>6</sub> (Duchefa)+琼脂 5 g·L <sup>-1</sup> +蔗糖 60 g·L <sup>-1</sup> +2,4-D 2 mg·L <sup>-1</sup>

1.2.4 分化培养基优化 以获得愈伤较多的组合(绥粳 4 号×东农 418)的 F<sub>2</sub> 为材料选取状态良好的愈伤组织接入不同的分化培养基中(表 3),每管接 4 个愈伤,每种培养基接 10 管,24~26℃ 条件下培养,光照时长 16 h,光强 12 000 lx。分化较好的愈伤 7 d 左右即可现出绿点,14~21 d 时分化的小苗可以长至 3 cm,此时即可取出转入生根培养基中。本研究中,以 30 d 为限计算分化率,分化率(%)=绿苗数/愈伤数×100。

1.2.5 生根培养基配方优化 选取一个组合(龙粳 51×特早香)F<sub>1</sub> 的花培苗进行生根培养试验,

仅调整多效唑和 6-BA 的含量,每个配方 5 次重复,观察花培苗生长状态,生根期培养基配方见表 4。

表 3 水稻花药培养分化培养基配方  
Table 3 Regeneration media formula of anther culture of rice

编号 No.	分化培养基配方 Regeneration media formula
1	MS+6-BA 2 mg·L <sup>-1</sup> + NAA 0.2 mg·L <sup>-1</sup> + 蔗糖 30 g·L <sup>-1</sup> + 琼脂 4 g·L <sup>-1</sup>
2	MS+6-BA 2 mg·L <sup>-1</sup> + NAA 0.2 mg·L <sup>-1</sup> + 多效唑 2.5 mg·L <sup>-1</sup> + 蔗糖 30 g·L <sup>-1</sup> + 琼脂 4 g·L <sup>-1</sup>
3	MS+脯氨酸 0.5 g·L <sup>-1</sup> + 山梨醇 20 g·L <sup>-1</sup> + 水解酪蛋白 1 g·L <sup>-1</sup> + NAA 1 mg·L <sup>-1</sup> + IAA 1 mg·L <sup>-1</sup> + 6-BA 0.2 mg·L <sup>-1</sup> + 蔗糖 30 g·L <sup>-1</sup> + 琼脂 4 g·L <sup>-1</sup>
4	MS+脯氨酸 0.5 g·L <sup>-1</sup> + 水解酪蛋白 1 g·L <sup>-1</sup> + NAA 1 mg·L <sup>-1</sup> + IAA 1 mg·L <sup>-1</sup> + 6-BA 0.2 mg·L <sup>-1</sup> + 蔗糖 30 g·L <sup>-1</sup> + 琼脂 4 g·L <sup>-1</sup>
5	MS+KT 2 mg·L <sup>-1</sup> + IAA 1 mg·L <sup>-1</sup> + 蔗糖 30 g·L <sup>-1</sup> + (CK) 琼脂 4 g·L <sup>-1</sup>

1.2.6 数据分析 所有数据录入 Excel 2010 软件,进行单因素方差分析。

表 4 水稻生根培养基配方

Table 4 Rooting media formula of rice

编号 No.	激素配比 Formula
1	1/2 MS+蔗糖 20 g·L <sup>-1</sup> + 琼脂 6 g·L <sup>-1</sup> 无激素
2	1/2 MS+蔗糖 20 g·L <sup>-1</sup> + 琼脂 6 g·L <sup>-1</sup> + 多效唑 3 mg·L <sup>-1</sup>
3	1/2 MS+蔗糖 20 g·L <sup>-1</sup> + 琼脂 6 g·L <sup>-1</sup> + 多效唑 6 mg·L <sup>-1</sup> + 6-BA 2.0 mg·L <sup>-1</sup>
4	1/2 MS+蔗糖 20 g·L <sup>-1</sup> + 琼脂 6 g·L <sup>-1</sup> + 多效唑 8 mg·L <sup>-1</sup>
5	1/2 MS+蔗糖 20 g·L <sup>-1</sup> + 琼脂 6 g·L <sup>-1</sup> + 多效唑 10 mg·L <sup>-1</sup> + 6-BA 2.0 mg·L <sup>-1</sup>

2 结果与分析

2.1 花药镜检

根据前人的经验,当大多数大孢子母细胞处于单核靠边期时,花药诱导效率最高<sup>[2]</sup>。从图 1 可以看出,本试验材料在叶枕距 5 cm 时,处于单核靠边期的细胞较少,约占 10%。随着叶枕距加大,处于单核靠边期的细胞数量逐渐增多,至叶枕距达到 6~7 cm 时,约有 80% 的细胞处于单核靠边期。

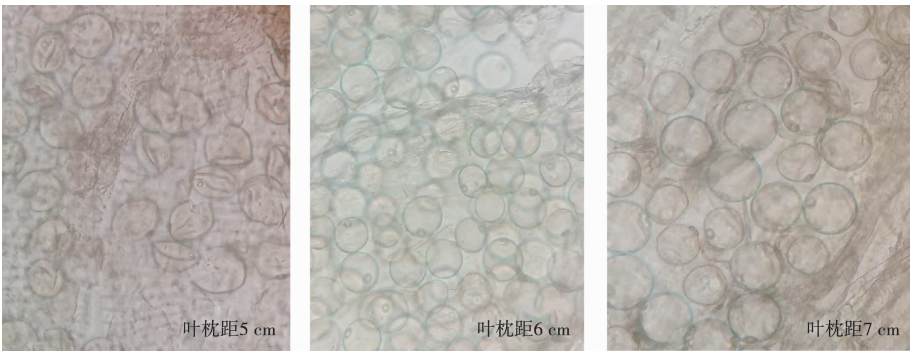


图 1 花粉大孢子母细胞镜检

Fig. 1 Megasporocytes of pollen under microscope

2.2 诱导培养基优化

从图 2 可以看出,1 号和 4 号配方诱导率与其他配方有所提高,(Duchefa)N<sub>6</sub> 培养基比国产(海博)N<sub>6</sub> 培养基的愈伤诱导率略有优势,凝胶比琼脂的愈伤诱导率略有优势。蔗糖浓度对愈伤诱导率的影响较为明显,蔗糖浓度为 60 g·L<sup>-1</sup> 时,愈伤诱导率相对较高,且产生的愈伤组织结构致密,颜色嫩黄。诱导培养基中加入 KT 后,对水稻花药

愈伤诱导起到了负面的影响。说明针对本试验材料五优稻 2 号,KT 不能提高其愈伤诱导率,而使用高质量的 N<sub>6</sub> 培养基和凝胶会提高愈伤诱导率。

2.3 分化培养基优化

从表 5 试验结果来看,4 种改良培养基中,第 4 种配方分化率为 17.6%,比对照的 15.4% 略有提高。6-BA 和 NAA 的组合中,愈伤组织增殖较

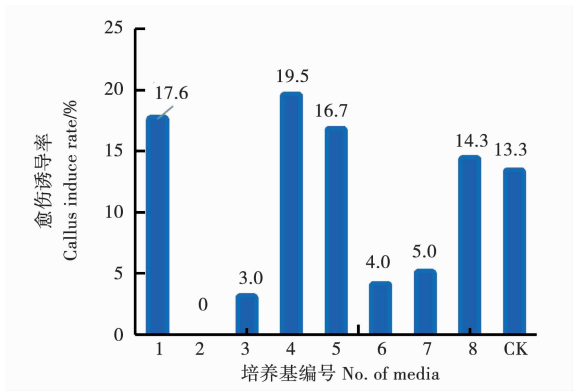


图 2 不同诱导培养基愈伤诱导率

Fig. 2 Callus induce rate in different induction media  
多,但分化率较低。3 号配方在 4 号配方的基础上增加了山梨醇,结果反而影响了分化率。

2. 4 生根培养基中多效唑的作用

从图 3 可以看出,未加多效唑的 1 号培养基花培苗生长迅速,植株较细,分蘖较少。2 号培养基中加入 3 mg·L<sup>-1</sup> 的多效唑,对花培苗产生了一些影响,植株生长稍慢,叶片增厚变宽,部分花培

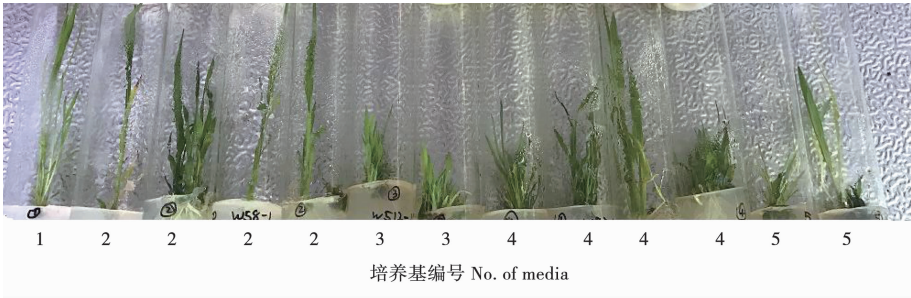


图 3 不同多效唑浓度对花培苗生长的影响

Fig. 3 Effects on growth of anther culture seedlings by different concentration of MET

由本试验可知,加入适量多效唑可以起到显著壮苗促分蘖的作用,并且能够显著增加试管苗的保存时间,加入 6-BA 并不利于水稻分蘖。

3 结论与讨论

3. 1 讨论

本试验经过镜检得到的结果是叶枕距达到 6~7 cm 时,约有 80% 以上的细胞处于单核靠边期。

然而,经过对不同地点,不同特性的水稻材料进行综合分析发现,叶枕距不能成为取穗的唯一标准。如 2017 年孕穗前发生了两次低温,按照往年叶枕距 5~7 cm 的标准,绝大部分材料的花药成熟度均不达标,尚未达到单核靠边期;有部分早

苗分蘖较多。3 号和 4 号培养基中随着多效唑浓度的提高,花培苗分蘖增多,生长变慢,但由于加入了 6-BA,3 号培养基中的幼苗生长严重受阻。5 号培养基中 MET 浓度达到了 10 mg·L<sup>-1</sup>,花培苗生长受到严重影响,甚至黄化。

表 5 水稻花药培养分化培养基配方和结果

Table 5 Formula and results of regeneration media of anther culture in rice

编号 No.	分化率 Regeneration rate/%	与对照相比愈伤和分化苗状态 Status of callus and plants
1	13. 7	出绿苗略晚
2	4. 0	愈伤增殖较多,仅现绿点和小芽,绿苗少
3	3. 2	愈伤增殖较多,分化较晚,绿苗较少
4	17. 6	愈伤增殖较多,绿苗较多,分化时间与对照同期
5(CK)	15. 4	

熟材料当叶枕距仅为 5 cm 时就已经开始抽穗。水稻资源品种繁多,来源不同,特性不同,不能仅以叶枕距作为标准进行取材,而应该结合品种特性、取材地的气候条件等多方面因素来确定取材标准。因此需要建立一个水稻花药培养取材的多重标准,才能提高花药培养效率。经过几年的经验累积,本课题初步确定了一套多重的取穗标准:尽量选取主穗,叶枕距 5~7 cm,且穗部饱满(部分早熟的材料可降低至 5 cm);1/2 以上的颖壳颜色转为浅绿色;花药长度达到内颖壳的 1/2 以上,2/3 最佳。取材多重标准的确定能更好的判断稻穗进行花药培养的适宜时期,避免了因气候等原因造成的选材误差,极大地提高花药培养的效率。

黑龙江省第一、二积温区多以长粒和香型为主要育种目标。五优稻 2 号是常用的优质亲本,然而,以该品种作为亲本的组合花培效率极低。因此,针对五优稻 2 号这个材料,本研究专门做了诱导愈伤组织培养基的配方试验。从试验结果可以看出,诱导培养基中可以适当提高蔗糖的浓度,将普通的琼脂更换为凝胶诱导愈伤的效果会更显著。但是 KT 对五优稻 2 号的愈伤诱导只起到了负面的效果,这与赵海岩等的结论有所不同<sup>[5]</sup>。

在分化培养基中,水解酪蛋白、脯氨酸和山梨醇等营养元素的增加并未对水稻愈伤的分化起到显著的积极作用。在大批量的水稻花药培养工作中,也并不适用加入过多的试剂,这样会降低工作效率,提高花培成本。在实际生产管理中,挑选分化力强、状态好的愈伤组织,及时将适宜大小的愈伤组织转入分化培养基中,加强分化时期培养条件的温度、光照强度和光照时长的管理,对于提高分化率,降低白化苗率更为重要。

水稻花药培养一般在每年 7 月末 8 月初开始,10 月之前转入生根培养基中,至 10 月中旬左右即可进行移栽。更有甚者省去生根的步骤,直接进行移栽。然而,未经壮苗处理的花培苗长势弱、分蘖少、移栽成活率较低。而且,北方冬季的温室很难达到水稻正常生长的要求,在温室中栽培的水稻花培苗加倍率低,生长慢,分蘖少,直到次年的 4 月才能结少量的种子。而水稻南繁一般在 11 月末开始播种,涉及到花培苗与常规南繁种植水稻时期不一致的问题。

黑龙江省冬季在温室种植花培苗具有一定的难度,成本也比较高,且繁种量少,甚至不能及时收获。过去在没有南繁的条件下,有研究者在生根培养基中加入多效唑,降低蔗糖含量,并改变培养条件,降低培养温度、光照强度和时长,以期达到延缓试管苗生长,待次年田间栽培的目的<sup>[6-7]</sup>。本研究认为,在具备南繁条件时,应将花培苗全部南繁管理,这样可以提高花培苗成活率,尽早收获 DH 群体,真正达到加速育种进程的目的。但在南繁之前,生根期和苗期的管理也很重要,有助于提高移栽的成活率。本研究的结果证实,南繁前的生根管理中加入 3~6 mg·L<sup>-1</sup> 多效唑可以促进花培苗矮壮,分蘖,并延长在试管中的存活时间,

南繁时可直接将花培苗从试管中取出缓苗后移栽。这样就可以省略花培苗南繁前移栽在培养盘中的过程,极大地提高移栽成活率。

水稻花药培养涉及到的环节很多,每个环节都会影响培养效率。尤其是黑龙江省第一、二积温区的水稻品种中长粒香型品种多有籼稻血缘,与三积温区水稻材料相比,花培效率较低。本研究改进了取穗的外观标准,改良了针对部分亲本组合适用的愈伤诱导、分化培养基的配方,改进了生根期培养基和花培苗移栽前期的管理方式,从多个环节提高了水稻花药培养的效率。然而,水稻花药培养还存在白化苗和加倍率等问题,本研究尚未涉及到,在今后的工作中,将会列为重点进行研究。

### 3.2 结论

通过本研究得出结论:取穗要以叶枕距、颖壳颜色和花药长度等多重因素为标准;适用于以五优稻 2 号为亲本的诱导培养基配方为进口 N<sub>6</sub> + 凝胶 3.6 g·L<sup>-1</sup> + 蔗糖 60 g·L<sup>-1</sup> + 2,4-D 2 mg·L<sup>-1</sup>;分化培养基配方为 MS + KT 2 mg·L<sup>-1</sup> + IAA 1 mg·L<sup>-1</sup> + 蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup> + 琼脂 4 g·L<sup>-1</sup>,同时辅以 16 h 光照;生根培养基中加入 3~6 mg·L<sup>-1</sup> 多效唑,可以壮苗促分蘖,提高移栽成活率。

### 3.3 建议及展望

本课题组在田间取材时发现,黑龙江省第一、二积温带的水稻育种者在配置杂交组合时做的重复较少,F<sub>1</sub> 种植的个体数仅 2~10 株,严重影响了花药培养时取穗的数量和质量。因此建议想要开展花培育种的单位增加 F<sub>1</sub> 的田间种植数量,确保花药培养的初始基数,从而保证每个杂交组合都能够获得一定数量的 DH 群体。另外,花药培养确实耗费大量的人力物力,因此一定要选取有希望出优良后代的杂交组合来进行花药培养,从另一个角度来提高花培效率。总之,充分利用好花药培养技术,将会使黑龙江省第一、二积温区的水稻育种工作获得更大的突破。

### 参考文献:

- [1] 姜健,金成海,侯春香,等.水稻花药培养研究与应用进展[J].中国农学通报,2001,17(4):49-52.
- [2] 陈红,秦瑞珍.水稻花药培养过程中各种影响因子的研究进展[J].中国农业科技导报,2007,9(3):52-56.

[3] 马文东,李修平,李智媛. 水稻花药培养的影响因素研究[J]. 黑龙江农业科学,2013(11):1-4.

[4] 季彪俊,陈启锋. 水稻花药培养技术的总结与探讨[J]. 福建农业大学学报,2001(1):22-28.

[5] 赵海岩,郑文静,王昌华,等. 水稻花药培养及后代选育[J]. 辽宁农业科学,2005(1):5-7.

[6] 王永新,刘亚琴. 水稻花培苗试管保存技术的研究[J]. 河北农业大学学报,1998(2):6-9.

[7] 陈新林,谢丽霞,张淑红,等. 水稻花培试管苗移栽技术及改进[J]. 北方水稻,2008,38(3):127-128.

# Conditional Optimization of Rice Anther Culture in First and Second Accumulated Temperature Zones of Heilongjiang Province

LIU Jian-xin<sup>1,2</sup>, WU Li-cheng<sup>2,3</sup>, WANG Guan<sup>4</sup>, LI Xi-chen<sup>1,2</sup>, LI Wei<sup>1,2</sup>, LIU Ming<sup>1,2</sup>, LIU Miao<sup>1,2</sup>, WANG Ling<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Crop Cultivation and Tillage, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 2. Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Crop Molecular Design and Germplasm Innovation, Harbin 150086, China; 3. Biotechnology Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 4. Heilongjiang Journal Press of Agricultural Science and Technology, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

**Abstract:** In order to improve the anther culture efficiency of rice and promote the application of the technology in the breeding of new *japonica* rice varieties in Heilongjiang Province, especially in the first and second accumulative temperate zones, in this paper, we used Wuyoudao, F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> of backbone parents in the first and second accumulated temperature zone of Heilanyjiang Province as materials, and improved several key links of rice anther culture, such as the selection criteria, medium formulation and culture conditions in the critical period. The results showed that the multiple criteria of choosing rice spikes; the color of glume, anther length and length of pulvinus; Formula of induction media suitable for Wuyoudao 2: imported N<sub>6</sub> + phytigel 3.6 g·L<sup>-1</sup> + sugar 60 g·L<sup>-1</sup> + 2,4-D 2 mg·L<sup>-1</sup>; Formula of regenerate media: MS + KT 2 mg·L<sup>-1</sup> + IAA 1 mg·L<sup>-1</sup> + sugar 30 g·L<sup>-1</sup> + agar 4 g·L<sup>-1</sup>, simultaneously supplemented by 16 h illumination; 3-6 mg·L<sup>-1</sup> MET in rooting media is good for tillering and improving transplant survival rate.

**Keywords:** rice; anther culture efficiency; optimization

## 《黑龙江农业科学》理事会

理事长单位	代表	理事单位	代表
黑龙江省农业科学院	院长 李文华	黑龙江生物科技职业学院	院长 李承林
副理事长单位	代表	农垦科研育种中心哈尔滨研究所	所长 姚希勤
黑龙江省农业科学院水稻研究所	所长 鄂文顺	黑龙江农业职业技术学院	院长 于波
黑龙江省农业科学院克山分院	院长 邵立刚	鹤岗市农业科学研究所	所长 姜洪伟
黑龙江省农业科学院黑河分院	院长 张立军	伊春市农业技术推广中心	主任 张含生
黑龙江省农业科学院绥化分院	院长 陈维元	甘南县向日葵研究所	所长 孙为民
黑龙江省农业科学院牡丹江分院	院长 张太忠	萝北县农业科学研究所	所长 张海军
常务理事单位	代表	黑龙江省农垦科学院水稻研究所	所长 解保胜
勃利县广视种业有限责任公司	总经理 邓宗环	黑龙江八一农垦大学农学院	院长 郭永霞
内蒙古丰垦种业有限责任公司	董事长 徐万陶	绥化市北林区农业技术推广中心	主任 张树春
		黑龙江省齐齐哈尔农业机械化学学校	校长助理 张北成