

## 粳稻F<sub>1</sub>小孢子培养条件的优化

刘成洪\*, 何婷\*, 郭桂梅, 高润红, 陈志伟, 徐红卫, 李颖波, 周龙华, 陆瑞菊\*\*, 黄剑华\*\*

上海市农业科学院生物技术研究所, 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海201106

**摘要:** 为了提高水稻小孢子培养效率, 加速小孢子培养技术在水稻育种中的应用, 本研究以上海本地早熟杂交粳稻品种‘申优17’为材料, 对F<sub>1</sub>小孢子培养中前期幼穗低温预处理时间(12和16 d)、诱导胚性愈伤转分化培养时间(4周、7周和13周)以及自发加倍频率等技术环节进行了研究。结果表明: 低温(4°C)处理水稻幼穗12 d在诱导愈伤组织产量和分化绿苗产量上都要优于16 d处理, 且在3个转分化培养时间上都显现出这一优势效果; 比较3个转分化培养时间, 其中7周的转分化培养时间可以获得较高的分化绿苗数; 小孢子再生植株中自发加倍成二倍体频率约为50%, 而单倍体约占40%。上述结果表明, 选择合适的幼穗低温预处理时间(1~2周)和转分化培养时间(7周)有利于提高水稻小孢子培养中的绿苗分化频率。

**关键词:** 粳稻; F<sub>1</sub>小孢子; 低温预处理; 绿苗

水稻(*Oryza sativa* L.)是我国最重要的粮食作物之一, 播种面积占粮食作物的1/3, 总产占粮食总产的40%, 对于保障我国粮食安全具有重要意义(肖娟等2016)。面对巨大人口增长对稻米的需求, 需要加速育种技术创新, 不断培育出产量高、品质优的水稻新品种。我国的水稻育种技术在育种上不断突破, 取得了三次大的飞跃, 包括矮秆化育种、杂交稻育种和超级稻育种(王月华等2012)。在水稻育种技术中, 花药培养技术近几十年来发展迅速, 该技术具有加速性状稳定、缩短育种年限、提高选择效率等优点, 在种质资源创新、杂交优势利用以及水稻分子育种上被广泛应用(迟铭等2011; 吴丹等2015)。近几年来, 水稻小孢子培养技术也取得了一定进展, 为进一步将小孢子培养技术应用于水稻育种实践提供了可能。小孢子培养技术是在花药培养技术基础上发展而来的, 与花药培养技术相比具有更多优越性, 如单细胞起源、易于基因突变和转化、避免花药壁影响、培养效率更高等(王玲仙等2009; 郭桂梅等2014)。这些优势使得水稻小孢子培养技术更具有吸引力, 但有关水稻小孢子培养的报道还不多见, 水稻小孢子培养技术仍然需要进一步突破基因型障碍, 提高诱导频率和分化频率, 特别是针对生产上主栽水稻品种要大力开展小孢子培养技术优化, 加强小孢子培养技术在水稻育种技术上的应用。

F<sub>1</sub>小孢子是基因重组类型最丰富的群体, 建立高效小孢子培养技术体系可以在F<sub>1</sub>小孢子培养阶段实现胁迫筛选和稳定纯合, 快速获得耐逆性提高的种质材料, 这一育种方法已在大麦上获得成功。陆瑞菊等(2012)对大麦采用理化诱变后开

展小孢子培养, 在培养阶段采用NaCl胁迫培养, 获得了4份耐盐性比亲本明显提高的DH株系材料。徐红卫等(2015)以2个耐低氮大麦亲本杂交, 在F<sub>1</sub>小孢子培养阶段采用低氮胁迫, 获得了10份耐低氮性优于双亲的杂交后代DH株系材料。此外, 利用诱变小孢子结合氮胁迫培养方法也获得了与原始品种氮素利用率差异显著的2份突变体材料(徐红卫等2016)。在水稻中开展这一育种方法研究, 提高水稻F<sub>1</sub>小孢子培养效率是该项新技术研发的工作基础。

‘申优17’是上海市农业科学院选育的粳型三系杂交水稻品种, 亲本来源为‘申武1A’(♀)和‘申繁17’(♂), 2014年通过上海市品种审定, 具有产量高、熟期早等特点(程灿等2017), 为上海地区的水稻主栽品种之一。本研究以该品种杂交稻为材料, 开展游离小孢子培养, 对小孢子培养中低温预处理时间、转分化培养时间以及再生植株倍性鉴定等技术环节进行了研究, 以期提高水稻F<sub>1</sub>小孢子的培养效率, 为水稻的小孢子育种技术研发奠定基础。

## 材料与方法

### 1 材料

以上海本地杂交粳稻(*Oryza sativa* L.)品种‘申优17’为供试材料。

收稿 2017-06-27 修定 2017-08-18

资助 上海市科技兴农重点攻关项目(应用基础类)(沪农科攻字(2015)第6-1-4号)和上海市种业发展项目(沪农科种字(2015)第2号)。

\* 共同第一作者。

\*\* 共同通讯作者(E-mail: luruiju62@163.com; swl@saas.sh.cn)。

## 2 方法

### 2.1 水稻幼穗低温处理

2016年8月下旬, 从大田选取小花中小孢子发育处于单核中、晚期的幼穗, 修剪去除多余叶片以保鲜袋保湿包裹后, 放入4°C冰箱中, 分别处理12和16 d。

### 2.2 小孢子游离及常温预处理

接花药前, 穗子用10%消毒灵灭菌10 min, 无菌水冲洗3~5次。每个50 mL塑料离心管接1 200枚花药, 加9 mL提取液(60 g·L<sup>-1</sup>甘露醇、1.1 g·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>、0.976 g·L<sup>-1</sup> MES, pH 5.8, 过滤灭菌)使用高速匀浆机旋切, 使花药内小孢子充分游离, 用300目筛网过滤游离后的小孢子溶液, 收集滤液于13 mL玻璃离心管中, 以400 r·min<sup>-1</sup>转速离心5 min, 去除上清液加3 mL提取液得到小孢子悬浮液, 置于30 mm×15 mm培养皿中, Parafilm封口, 在25°C暗培箱中处理3 d。

### 2.3 小孢子纯化及诱导培养

25°C黑暗处理后, 以21%蔗糖溶液纯化小孢子悬浮液, 加无糖溶液调节渗透压以600 r·min<sup>-1</sup>转速离心5 min, 去除上清液加1.5 mL诱导培养基接种于培养皿中, 封口, 置于28°C暗培箱中诱导愈伤组织。

### 2.4 愈伤分化及壮苗

将诱导培养基中生长18 d的愈伤组织转接到分化培养基上, 25°C培养, 以单个培养皿中愈伤组织分化出的绿苗数作为绿苗产量, 同时记录白苗数。

分化形成的绿苗长至3~4 cm左右高时, 转接至壮苗培养基中, 培养条件同分化阶段, 水稻小孢子再生植株生根迅速旺盛, 4周后进行水培。

### 2.5 水培及倍性鉴定

水培2周后开始小孢子再生植株的倍性鉴定, 剪取约1.5 cm长水稻叶片置于1.5 mL EP管中, 经液氮迅速冷冻后用研磨棒轻轻捣碎, 加入0.5 mL LB-01 buffer (15 mmol·L<sup>-1</sup> Tris、2 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O、80 mmol·L<sup>-1</sup> KCl、20 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、0.1% Trixon X-100), 上下混匀组织液, 用400目尼龙筛网过滤, 收集滤液于新的EP管中, 加入0.2 mL PI/RNase staining buffer混匀, 避光静置20 min后采用BD Accuri C6流式细胞仪进行倍性检测, 使用BD Accuri C6 Software软件进行分析。

## 3 培养基

诱导培养基为改良N<sub>6</sub>基本培养基, 添加麦芽糖75 g·L<sup>-1</sup>、谷氨酰胺750 mg·L<sup>-1</sup>、2,4-D 2.0 mg·L<sup>-1</sup>和KT 0.5 mg·L<sup>-1</sup>, pH 5.8。分化培养基以2/3MS为基本培养基, 添加麦芽糖30 g·L<sup>-1</sup>、6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>、KT 0.5 mg·L<sup>-1</sup>、NAA 0.05 mg·L<sup>-1</sup>, 用6 g·L<sup>-1</sup>琼脂粉固化培养基, pH 5.8。壮苗培养基以1/2MS为基本培养基, 添加蔗糖30 g·L<sup>-1</sup>、IAA 0.4 mg·L<sup>-1</sup>、矮壮素2.5 mg·L<sup>-1</sup>, 用6 g·L<sup>-1</sup>琼脂粉固化培养基, pH 5.8。诱导培养基为过滤灭菌, 分化培养基和壮苗培养基采用121°C、0.11 MPa高温、高压灭菌15和20 min。

## 4 统计指标

小孢子在28°C下暗培养18 d时, 吸尽诱导培养基, 差重法称量单个培养皿中愈伤质量, 即为愈伤组织产量, 绿苗产量为每皿愈伤组织分化的绿苗株数, 白苗产量为每皿愈伤组织分化的白苗株数。

## 实验结果

### 1 低温预处理不同时间对小孢子愈伤诱导产量的影响

对幼穗进行低温预处理, 是诱导小孢子启动离体胚胎发育程序的重要步骤。针对水稻幼穗低温(4°C)预处理, 本研究采用了2个不同时间(12和16 d), 结果表明不同低温预处理时间对小孢子培养中诱导胚性愈伤组织的产量有较大影响, 相比12 d的低温预处理幼穗, 更长时间的低温预处理时间(16 d)显著降低了小孢子培养中诱导胚性愈伤组织的产量, 平均每皿愈伤产量下降近一半(图1)。

### 2 低温预处理不同时间对小孢子再生苗分化的影响

小孢子离体培养技术的最终目标是要利用前期脱分化诱导获得胚性愈伤组织诱导分化形成大量再生苗(绿苗)。针对水稻幼穗的不同低温预处理时间对小孢子培养后的再生苗分化也产生了较大影响, 相比12 d的低温预处理幼穗, 更长时间的低温预处理时间(16 d)显著降低了小孢子培养后再生苗分化数量(图2-A)。通过比较两种时间长度的低温预处理后每100 mg愈伤产生绿苗或白苗数量, 结果表明单位质量的愈伤组织再分化苗的数目因低温预处理时间的延长而降低, 可以看出这一变化并不是较短的低温预处理时间获得了更多的愈

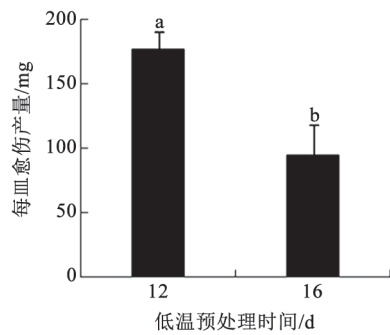


图1 幼穗低温预处理时间对游离小孢子培养诱导愈伤产量的影响

Fig.1 Effects of different time of low-temperature pretreatment on young spikes on the induced callus yields in isolated microspore culture

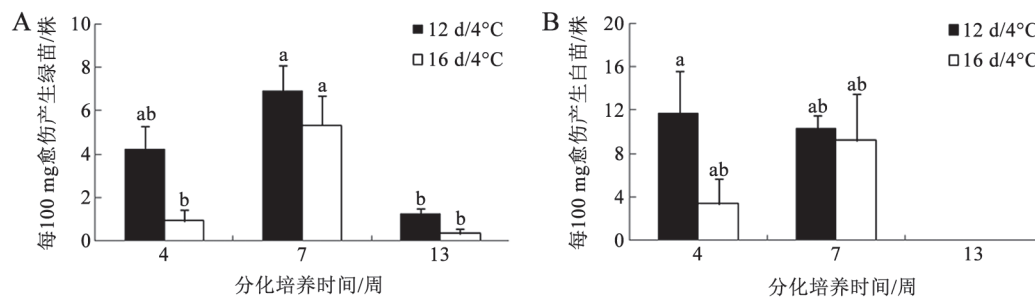


图2 幼穗低温预处理时间和小孢子诱导愈伤转分化时间对绿苗(A)与白苗(B)产量的影响

Fig.2 Effects of different time of low-temperature pretreatment on young spikes and microspore-derived calli transferring for differentiation on the yields of green plants (A) and albino plants (B)

成苗的影响在不同转分化时间都表现较为一致。

#### 4 小孢子再生植株倍性分布

利用流式细胞仪检测方法, 对小孢子再生绿苗(图3)中101株植株倍性进行了检测, 根据流式细胞仪对其叶片中DNA含量检测, 鉴定再生植株主

要分为单倍体、二倍体和四倍体三种类型(图4)。鉴定出42株为单倍体(41.6%), 51株为二倍体(50.5%), 8株为四倍体(7.9%)。结果表明水稻品种‘申优17’的小孢子再生群体中, 近一半为二倍体, 而单倍体仍占有很高比例。

#### 3 不同分化培养时间对小孢子再生苗分化的影响

不同转分化培养时间对小孢子诱导获得的胚性愈伤组织的生长状态和分化成苗能力也有重要影响。通过比较不同转分化培养时间(即愈伤分化时间分别为4、7和13周)每100 mg愈伤产生的绿苗和白苗数量, 结果表明经7周诱导的愈伤组织转分化获得绿苗较多(图2-A), 尽管白化苗数量也相对较高, 但绿苗/白苗比例较4周转分化时间的绿苗/白苗比例低; 更长时间(13周)诱导获得的愈伤组织分化绿苗显著下降, 并且全部为绿苗, 未检测到白苗(图2-B)。同时可以看出幼穗的低温预处理时间对分化

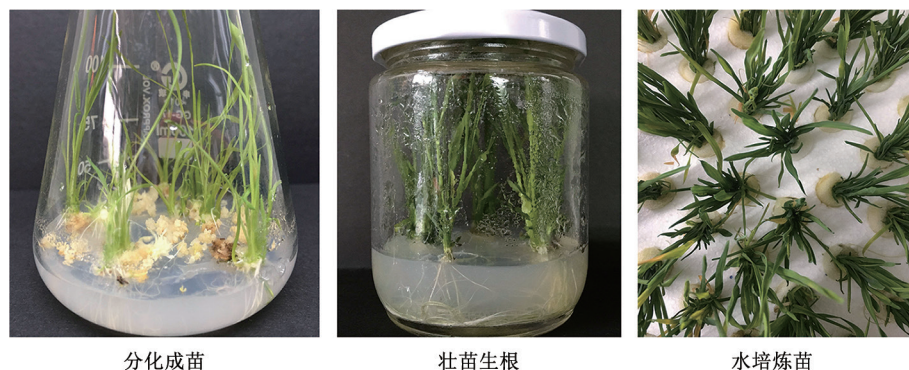


图3 粳稻‘申优17’F<sub>1</sub>小孢子培养再生苗

Fig.3 Green plants regenerated from F<sub>1</sub> microspore culture for japonica rice variety ‘Shenyou 17’



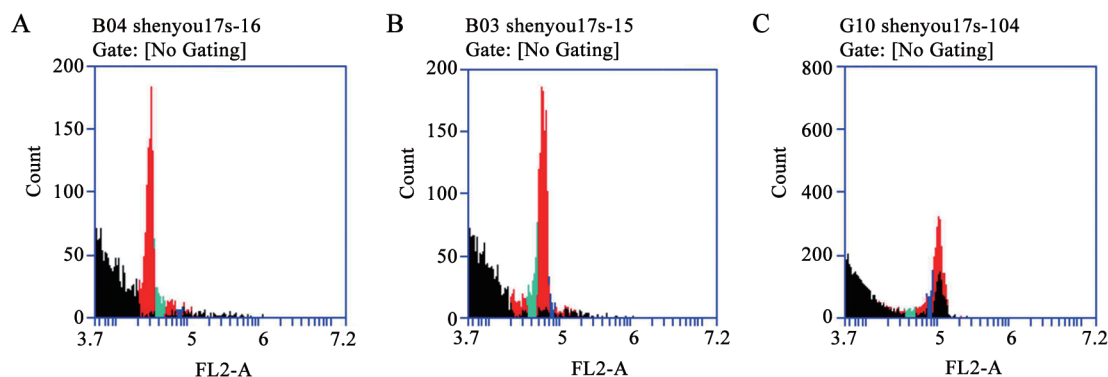


图4 流式细胞仪检测小孢子再生苗叶片细胞DNA峰值

Fig.4 Peak values of cell DNA content in leaves from microspore-derived plants detected by flow cytometer

A: 单倍体; B: 二倍体; C: 四倍体。

## 讨 论

### 1 低温预处理幼穗对水稻小孢子培养的影响

胁迫(stress)是诱导小孢子转变花粉发育途径,启动雄核发育(androgenesis)的“扳机”(Touraev等1997)。取供体植株幼穗直接进行低温预处理,操作简便,是小孢子培养前期常用的胁迫措施。低温预处理时期一般都选择小孢子单核靠边中、晚期,目前已在油菜、玉米、小麦、大麦等多种作物中成功诱导离体小孢子启动雄核发育(Ferrie和Caswell 2011; Islam和Tuteja 2012)。不同水稻品种由于基因型不同,小孢子培养中对低温预处理措施的诱导反应也存在差异。早期报道水稻小孢子培养前期幼穗低温预处理对于诱导小孢子启动分裂极为有效,粳稻品种一般8°C处理18 d左右或4°C处理10 d左右,籼稻品种10°C处理10 d左右(邢小黑1995)。Xie等(1997)在粳稻品种‘Taipei 309’小孢子培养中研究发现17~27 d的低温(6±1)°C预处理幼穗可以获得较多的愈伤和再生分化苗,而超过27 d则会影响到愈伤诱导和植株再生。陆瑞菊等(2007)对粳稻3个品系小孢子培养中采用低温(5°C)预处理8 d比4 d的培养效果好,成倍提高了愈伤组织产量和绿苗产量。郭桂梅等(2014)针对4份水稻材料采用了12~14 d的低温(4°C)预处理,结合游离小孢子后再用2 d热击处理能提高愈伤组织产量和绿苗产量。本研究中针对上海本地杂交粳稻品种‘申优17’,认为12 d的低温(4°C)预处理诱导效果明显优于16 d。综合来看,1~2周的低温(4°C)预处理幼穗对于后期小孢子培养诱导雄核发育发生可能是比较有利的。

此外,前期低温预处理时间对后期小孢子培养中愈伤诱导的数量(诱导愈伤产量)和质量(分化绿苗产量)都产生了影响,表明这一处理措施对于小孢子启动雄核发育途径的重编程起了重要作用,不仅影响到离体培养小孢子的脱分化进程,而且更进一步影响诱导愈伤的再分化进程,其机制还有待于进一步研究。

### 2 水稻小孢子再生植株的自发加倍频率差异

目前水稻中小孢子再生植株中自发加倍获得二倍体的频率约为50% (赵慧霞等2009),而杂交水稻和常规杂交材料的花药培养后代相比,会出现较多的单倍体但总体差别不大,自发加倍率一般在40%~50% (朱德瑶和丁效华1992)。这些报道与本研究中粳稻品种‘申优17’小孢子培养获得的二倍体分布比例(50.5%)基本一致。但国外也有一些研究者在粳稻的小孢子或花药培养中,获得了更高频率的二倍体植株,如早期Cho和Zapata (1988)在粳稻品种‘Taipei 309’的小孢子培养中,获得二倍体频率达到72%; Mercy和Zapata (1986)报道在粳稻的花药培养再生绿苗中,56.4%为二倍体植株; Serrat等(2014)报道对地中海的粳稻进行花药培养获得的再生绿苗中,69%为二倍体植株。由此可见,在已报道的水稻花药或小孢子培养中获得二倍体的自发加倍频率存在差异,这种差异很可能与培养中使用不同的预处理措施和培养方法有关。有研究表明禾谷类作物小孢子培养中高自发加倍频率可能与前期胁迫处理影响了初次细胞分裂中细胞壁的形成有关(Shim等2006),但有关水稻

小孢子培养中染色体自发加倍的时期和机制仍有待进一步研究。

综上所述, 选择合适的幼穗低温预处理时间(1~2周)和转分化培养时间(7周)有利于提高水稻小孢子培养中的绿苗分化频率。要将小孢子培养技术应用于水稻育种实践, 除了提高小孢子再生绿苗频率外, 同时也需要考虑如何提高单倍体的自发加倍频率, 获得更多的加倍单倍体(double haploid)植株, 减少后期倍性鉴定和染色体加倍工作量。

### 参考文献

- Cheng C, Zhou JH, Niu FA, Chu HW, Wang XX, Luo ZY, Wang XQ, Cao LM, Yuan Q (2017). Mechanized seed production techniques of new japonica hybrid rice combination Shen you 17. *Hybrid Rice*, 32 (3): 25–26 (in Chinese) [程灿, 周继华, 牛付安, 储黄伟, 王新新, 罗忠永, 王新其, 曹黎明, 袁勤(2014). 杂交粳稻新组合申优17机械化制种技术. *杂交水稻*, 32 (3): 25–26]
- Chi M, Fang ZW, Li J, Fan JW, Qin DR, Xu DY (2011). Advances in the application of anther culture in rice breeding. *Jiangsu Agric Sci*, 39 (6): 111–113 (in Chinese) [迟铭, 方兆伟, 李健, 樊继伟, 秦德荣, 徐大勇(2011). 花药培养在水稻育种中的应用研究进展. *江苏农业科学*, 39 (6): 111–113]
- Cho MS, Zapata FJ (1998). Callus formation and plant regeneration in isolated pollen culture of rice (*Oryza sativa* L. cv. Taipei 309). *Plant Sci*, 58 (2): 239–244
- Ferrie AMR, Caswell KL (2011). Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 104 (3): 301–309
- Guo GM, Gao RH, Bu SM, Zou L, Du ZZ, Liu CH, Xu HW, He T, Lu RJ (2014). Effects of pretreatments on callus induction and green plantlet differentiation in rice microspore culture *in vitro*. *Acta Agric Shanghai*, 30 (5): 51–55 (in Chinese with English abstract) [郭桂梅, 高润红, 卜姝明, 邹磊, 杜志钊, 刘成洪, 徐红卫, 何婷, 陆瑞菊(2014). 预处理对水稻小孢子诱导愈伤组织产量和绿苗分化的影响. *上海农业学报*, 30 (5): 51–55]
- Islam SMS, Tuteja N (2012). Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. *Plant Sci*, 182 (1): 134–144
- Lu RJ, Sun YF, Wang YF, Shan LL, Huang JH (2007). A study on improving responses of *in vitro* culture of anther and isolated microspore in japonica rice (*Oryza sativa* L.). *J Hunan Agric Univ (Nat Sci)*, 33 (8): 1–4 (in Chinese with English abstract) [陆瑞菊, 孙月芳, 王亦菲, 单雨丽, 黄剑华(2007). 提高粳稻花药小孢子离体培养反应的研究. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 33 (8): 1–4]
- Lu RJ, Xu HW, Chen ZW, He T, Du ZZ, Gao RH, Wang YF, Zou L, Guo GM, Pu SM, et al (2012). Screening of variants derived from barley (*Hordeum vulgare* L.) microspore culture salt tolerance. *Plant Physiol J*, 48 (11): 1069–1078 (in Chinese with English abstract) [陆瑞菊, 徐红卫, 陈志伟, 何婷, 杜志钊, 高润红, 王亦菲, 邹磊, 郭桂梅, 卜姝明, 等(2012). 源于小孢子培养的大麦耐盐变异体获取. *植物生理学报*, 48 (11): 1069–1078]
- Mercy ST, Zapata FJ (1986). Chromosomal behavior of anther culture derived plants of rice. *Plant Cell Rep*, 5 (3): 215–218
- Serrat X, Cardona M, Gil J, Brito AM, Moysset L, Nogues S, Lalanne E (2014). A Mediterranean japonica rice (*Oryza sativa*) cultivar improvement through anther cultur. *Euphytica*, 195 (1): 31–44
- Shim YS, Kasha KJ, Simion E, Letarte J (2006). The relationship between induction of embryogenesis and chromosome doubling in microspore cultures. *Protoplasma*, 228 (1): 79–86
- Touraev A, Vicente O, Heberle-Bors E (1997). Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci*, 2 (8): 297–302
- Wang LX, Lin ZL, Bai XG, Lü GL, Fu J, Yin FY, Huang XQ, Cheng ZQ (2009). Recent advance in isolated microspores cultivation of rice. *Biotechnology*, 19 (6): 92–95 (in Chinese with English abstract) [王玲仙, 蔺忠龙, 白现广, 吕广磊, 付坚, 殷富有, 黄兴奇, 程在全(2009). 水稻游离小孢子培养最新研究进展. *生物技术*, 19 (6): 92–95]
- Wang YH, He H, Pan XH (2012). Progress review on technology of rice breeding in China. *Acta Agric Jiangxi*, 24 (2): 26–28 (in Chinese with English abstract) [王月华, 何虎, 潘晓华(2012). 我国水稻育种技术发展历程回顾. *江西农业学报*, 24 (2): 26–28]
- Wu D, Yao DP, Li YG, Wu J, Wu FG, Deng QY (2015). Research progress of rice anther culture technology and its application in breeding. *Hunan Agric Sci*, (2): 139–142 (in Chinese with English abstract) [吴丹, 姚栋萍, 李莺歌, 吴俊, 伍富根, 邓启云(2015). 水稻花药培养技术及其育种应用的研究进展. *湖南农业科学*, (2): 139–142]
- Xiao J, Yan HH, Yang YQ, Liang YS, Nan WB, Zhang HM, Qin XJ (2016). Screening and research of different rice (*Oryza sativa*) varieties based on nitrate absorption and utilization in seedlings. *Plant Physiol J*, 52 (12): 1941–1949 (in Chinese with English abstract) [肖娟, 严欢欢, 杨永清, 梁永书, 南文斌, 张汉马, 秦小健(2016). 不同品种水稻苗期硝态氮吸收与利用效率差异的筛选及研究. *植物生理学报*, 52 (12): 1941–1949]
- Xie JH, Gao MW, Liang ZQ, Shu QY, Cheng XY, Xue QZ (1997). The effect of cool-pretreatment on the isolated microspore culture and the free amino acid change of anthers in japonica rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Physiol*, 151 (1): 79–82
- Xing XH (1995). Advances on the isolated microspores culture of cereal crops. *Chin Bull Bot*, 12 (a01): 21–24 (in Chinese) [邢小黑(1995). 禾谷类作物游离花粉培养研究进展. *植物学报*, 12 (a01): 21–24]
- Xu HW, Lu RJ, Liu CH, Guo GM, He T, Gao RH, Li YB, Hu HT, Huang SH, Fang CY, et al (2015). Evaluation of low nitrogen tolerance of homozygous population derived from F<sub>1</sub> microspore culture under nitrogen stress in barley. *J Triticeae Crops*, 35 (12): 1646–1652 (in Chinese with English abstract) [徐红卫, 陆瑞菊, 刘成洪, 郭桂梅, 何婷, 高润红, 李颖波, 胡翰彤, 黄赛华, 方春燕, 等(2015). 源于大麦F<sub>1</sub>小孢子氮胁迫培养自交一代的耐低氮性评价. *麦类作物学报*, 35 (12): 1646–1652]
- Xu HW, Wang YF, Liu CH, Huang CH, Fang CY, He T, Guo GM, Gao RH, Lu RJ, Huang JH (2016). Difference analysis in the activity of keyenzymes involved in carbon and nitrogen metabolisms between the original cultivator of barley and mutants which are derived form microspore culture. *Plant Physiol J*, 52

- (12): 1935–1940 (in Chinese with English abstract) [徐红卫, 王亦菲, 刘成洪, 黄赛华, 方春燕, 何婷, 郭桂梅, 高润红, 陆瑞菊, 黄剑华(2016). 大麦小孢子突变体与原始品种中碳氮代谢关键酶活性差异分析. 植物生理学报, 52 (12): 1935–1940]
- Zhao HX, Zhang P, Chen Y, Zhang R, Shen JS, Zeng L, Xiao PC (2009). Primary study on increasing achievement rate of double haploid of anther cultured indica rice. *Crops*, (5): 60–63 (in Chinese) [赵慧霞, 张鹏, 陈勇, 张仁, 沈久淑, 曾莉, 肖培村(2009). 提高籼稻花药培养二倍体得苗率的初步研究. 作物杂志, (5): 60–63]
- Zhu DY, Ding XH (1992). Application of anther-culture in hybrid rice breeding. *Acta Agric Jiangxi*, 4 (2): 151–156 (in Chinese) [朱德瑶, 丁效华(1992). 花药培养在杂交水稻中的应用. 江西农业学报, 4 (2): 151–156]

## Optimization of the culture procedures for F<sub>1</sub> microspores from japonica rice (*Oryza sativa* L.)

LIU Cheng-Hong\*, HE Ting\*, GUO Gui-Mei, GAO Run-Hong, CHEN Zhi-Wei, XU Hong-Wei, LI Ying-Bo, ZHOU Long-Hua, LU Rui-Ju\*\*, HUANG Jian-Hua\*\*

*Biotech Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China*

**Abstract:** In order to improve the efficiency of microspore culture in rice and explore the application of the culture technology in rice breeding, the local variety ‘Shenyou 17’ in Shanghai zone, an early maturing japonica rice hybrids was used as materials to improve the culture procedures for microspores isolated from F<sub>1</sub> plants. The low-temperature pretreatment period on young spikes (12 and 16 d), the time of induced embryonic calli to transfer to differentiation medium (4, 7 and 13 weeks) and the frequency of spontaneous chromosome doubling were studied in this study. The results showed that the low-temperature (4°C) pretreatment on young spikes for 12 days achieved higher yields of both induced callus and regenerated green plants than the pretreatment for 16 days, which is consistent no matter what the time of transferring for differentiation. However, the highest yield of green plants was obtained in 7 weeks of induced calli transferred for differentiation when comparing three periods of transferring for differentiation. In addition, half of microspore-derived plants were diploids by spontaneous chromosome doubling, and the percent of haploids is forty or so. In conclusion, the optimized periods of low-temperature pretreatment on young spikes (1–2 weeks) and induced calli to transfer for differentiation (7 weeks) are preferred to improve the yield of green plants in microspore culture for japonica rice.

**Key words:** japonica rice; F<sub>1</sub> microspores; low-temperature pretreatment; green plants

Received 2017-06-27 Accepted 2017-08-18

This work was supported by Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (Grant No. G2015060104) and Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (Grant No. Z201502).

\*Co-first authors.

\*\*Co-corresponding author (E-mail: luruiju62@163.com; sw1@saas.sh.cn).