分子植物育种(网络版), 2012 年, 第 10 卷, 第 1447−1457 页
Fenzi Zhiwu Yuzhong (Online), 2012, Vol.10, 1447−1457
http://mpb.5th.sophiapublisher.com

研究报告

Research Report

转玉米 C_4 型 *pepc* 水稻成熟胚为外植体的水稻悬浮细胞系的优化

王满, 李霞, 石牡丹, 钱宝云, 魏晓东, 方先文
江苏省农业科学院粮食作物研究所, 江苏省优质水稻工程技术研究中心, 南京, 210014
通讯作者: jspplx@jaas.ac.cn 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 61 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0061
收稿日期：2012 年 04 月 18 日
接受日期：2012 年 07 月 06 日
发表日期：2012 年 12 月 16 日

本文首次发表在《分子植物育种》 (2012 年第 10 卷第 6 期 644-654 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议，采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权，再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

王满等, 2012, 元转玉米 C_4 型 *pepc* 水稻成熟胚为外植体的水稻悬浮细胞系的优化, 分子植物育种(online) Vol.10 No.61 pp. 1447-1457 (doi:10.5376/mpb.cn.2012.10.0061)

引用格式(英文):

Wang et al., 2012, Optiming Cell Suspension Culture of Mature Embryo of Transgenic C_4 Phos- phoenolpyruvate Carboxylase (*pepc*) Rice, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.61 pp. 1447-1457 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0061)

摘　要 为了研究外源玉米光合作用关键酶 C_4 型磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)基因在 C_3 植物水稻中提高光合效率的分子机理，本研究以高表达玉米 C_4 型 *pepc* 水稻(PC)和未转基因野生型 Kitaake (WT)为材料，探索高效且稳定水稻悬浮细胞系建立的方法。结果表明：PC 成熟胚愈伤组织的诱导培养基中添加 2 mg/L 2,4−D 和 1 mg/L 6−BA，可出诱导出高频的愈伤组织；再通过 3 次继代培养(2~0.5 mg/L 2,4−D, 2~0.2 mg/L 6−BA, 1 mg/L ABA)，逐步降低 2,4−D 和 6−BA 的浓度，可获得了疏松、颗粒状且分散的愈伤组织块；然后转接到水稻悬浮细胞液体培养基中(0.5 mg/L 2,4−D, 0.2 mg/L 6−BA 和 1 mg/L ABA)，在 28℃下培养，新原液的比例为 3:1，经 42 d，可建立稳定且高效的供试水稻悬浮细胞系。

关键词 水稻; 转 C4 *pepc* 基因水稻; 成熟胚; 悬浮培养; 激素调优

Optiming Cell Suspension Culture of Mature Embryo of Transgenic C_4 Phos-phoenolpyruvate Carboxylase (*pepc*) Rice

Wang Man, Li Xia, Shi Mudan, Qian Baoyun, Wei Xiaodong, Fang Xianwenuzhi
Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Jiangsu High Quality Rice Research Center, Nanjing, 210014, P.R. China
Corresponding author, jspplx@jaas.ac.cn; Authors

Abstract In order to study the molecular mechanism to improve photosynthetic efficiency of the exogenous photosynthesis key enzyme, maize-C_4 phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) gene in the C_3 plant rice. In this research, transgenic rice with high expressed maize C_4 *pepc* gene (PC) and untransformed wild-type Kitaake (WT) used as materials to explore the establishment of efficient and stable rice suspension cell lines. The results showed that the PC mature embryo callus induction medium by adding 2 mg/L 2,4−D and 1 mg/L 6−BA can induce calli with high frequency; subculture three times (2~0.5 mg/L 2,4−D, 2~0.2 mg/L 6−BA and 1 mg/L ABA) and gradually reduce the concentration of 2,4−D and 6−BA, can generate loose, granular like and dispersed callus block; then transferred into in liquid medium of rice suspension cells (0.5 mg/L 2,4−D, 0.2 mg/L 6−BA and 1 mg/L ABA) under the culture of 42 days at 28℃ with dilutionratio of 3:1, a stable and high efficient rice suspension cell lines can be established.

Keywords Rice (*Oryza sativa* L.); Transgenic rice with C_4 *pepc* gene; Mature embryo callus; Cell suspension; Optimization by phytohormones

研究背景

植物细胞悬浮培养(Cell suspension culture)是指在液体培养基中的植物单细胞或小的单层细胞聚集体，在摇床上，以一定的转速和培养温度，进行培养的一种生物技术方法(吴春霞, 2009)。与常规栽培植株生长比较，植物悬浮细胞培养方法具有较多优势：来源一致、生长条件可控制、细胞生长均匀、用于研究的试材用量相对较少而且用于机理研究的各种反应更为迅速且一致等(王满和李霞, 2009)，它也可用于细胞全基因组杂交、获得植物原生质体、基因导入、次生代谢产物的生产、快速诱变出突变体，培育人工种子以及保护濒危木本植物等方面(陈志等, 2007; 袁金玲等, 2009)，可见，植物悬浮细胞技术体系在现代植物生物学的各个领域等都有广泛应用

(王满, 2011; 方文娟等, 2005)。

Maurice 等将玉米 C_4 光合途径中磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenlpyruvate carboxylase, PEPC)的全基因(*pepc*)，采用农杆菌介导的方法，导入水稻粳稻品种 Kitaake，实现了基因的高表达，并且籽粒产量表现提高了 10%~40% (Ku et al., 1999)，从而掀起了利用 C_4 光合特性改造 C_3 植物，以增强光合效率和提高水稻产量的热潮(李霞和焦德茂, 2005)。而伴随高表达玉米 C_4 型光合酶基因 *pepc* 水稻的稳定选育，不少的研究结果表明：高表达玉米 C_4 *pepc* 水稻具有高光效、抗旱以及耐光氧化胁迫等特性(李霞等, 2005a; Bandyopadhyay et al., 2007; 张边江等, 2008; 周宝元等, 2011)。但这里引发的问题是如何导入一个 C_4 光合途径关键酶的基因则引起水稻多种生理特性的改变？已有研究表明；该基因的高表达也引起了第二信使分子如磷脂酸(Li et al., 2011)、H_2O_2 (任承刚和李霞, 2010; 李霞和任承钢, 2012)和 NO (陈平波和李霞, 2012)的变化，暗示该基因的表达可能诱发了体内信号传导途径的变化，但这些研究均在整体植株水平上的。在细胞学水平乃至单细胞水平的深入研究，则更有利于该材料高光效特性分子机理的揭示，因此，该材料悬浮细胞的建立是在细胞和分子水平上研究其机理的前提和基础。

本研究以高表达玉米 C_4 型 *pepc* 基因水稻(PC)和未转基因的野生型 Kitaake (WT)为研究材料，从种子活力、外源激素的添加、渗透调节物质的调节以及培养温度等因素上，研究供试水稻悬浮细胞系的方法，试图进一步优化供试水稻悬浮培养条件，从而建立高效稳定的水稻成熟胚悬浮培养体系，该研究将为高表达玉米 C_4 *pepc* 水稻的分子机理的深入和遗传改良提供技术支撑。

1 结果分析

1.1 供试水稻种子发芽率影响其愈伤组织的诱导

两个供试材料 PC 和 WT 种子在 M8 基本培养基上 7 d 的发芽率均高达 95%，外施激素 6-BA，它的浓度从 0、0.5 mg/L、1 mg/L 以及 1.5 mg/L 增加，对供试水稻发芽率影响不大(表 1)。其中 WT 种子的发芽率则高于 PC 的，并且可以观察到，接种培养 14 d 后，WT 出愈率则始终高于 PC 的，而且适当加入低浓度的 6-BA (0.5 mg/L)，则可显著增加其出愈率，但随 6-BA 浓度的增加，则其出愈率则下降。可见，较强的水稻种子活力可能有利于水稻愈伤组织的早发。

已有研究表明，外源激素 ABA 添加对水稻等禾谷类作物胚性愈伤组织的诱导，胚状体的发生以及在继代培养中诱导出更多胚性愈伤组织等均起重要作用(李霞等, 2005b)。从表 2 看，加入 ABA 后，对 2 个供试材料的发芽率没有影响，但是将 6-BA 和 ABA 联合施用，则可部分增加 2 个供试水稻 7 d 后的出愈率，可见 ABA 单独添加对水稻的出愈作用有限，但当它和 6-BA 联合添加，则均可显著提高水稻的出愈率。

1.2 不同浓度 2,4-D 对供试水稻愈伤组织的诱导

表 3 表明了不同浓度 2,4-D 对供试水稻愈伤组织诱导的作用。对 WT 而言，以 N6 为基本培养基，再单独添加了不同浓度的 2,4-D，培养 7 d 后，其中添加 3 mg/L 或者 4 mg/L 2,4-D 才能诱导出供试材料的愈伤组织，其出愈率分别只有 13%和 10%，表明，在水稻成熟胚愈伤组织诱导的培养基中添加较高浓度的 2,4-D，对其愈伤组织诱导的尽早启动有一定促进效果。而对本研究的供试材料而言，3 mg/L 2,4-D 为适宜浓度，低于或高于这个浓度范围，则无此效应；但随着诱导时间的延长，当接种 21 d 后，在添加不同浓度 2,4-D 的 5 种培养基上，均诱导出了愈伤组织，而且随 2,4-D 浓度的增加，出愈率有增加的趋势，其中添加 5 mg/L 2,4-D 的培养基中水稻成熟胚的出愈率最高，其中 WT 的为 40.40%。但与 WT 相比，PC 的出愈率相对很低。表 4 也进一步显示，ABA 和 2,4-D 联合施用，也有利于 WT 愈伤组织的较早启动和高频发生，而 PC 则在 3 mg/L 2,4-D，1 mg/L 6-BA 和 1 mg/L ABA 三种激素联合施用的培养基上，略微提高其出愈率。可见，在水稻成熟胚愈伤组织诱导中，不同的基因型对激素的反应是不同的，在 2,4-D 脱分化的基础上，适当添加 ABA 或者 6-BA 和 ABA 联合使用，有利于提高水稻成熟胚的愈伤组织的诱导率。

1.3 有机附加物对供试水稻诱导愈伤组织的影响

不少研究显示，附加有机成分能够提高愈伤组织的出愈率(李霞等, 2008; 胡燕梅等, 2010)。表 5 结果表明，PC 在添加 2 mg/L 2,4-D 和 1 mg/L ABA 的愈伤组织诱导培养基中，再继续添加 2.8 g/L 脯氨酸和 0.3 g/L 水解酪蛋白，接种 21 d 后，出愈率高达 84.30%，显著提高了其出愈率，而加入 2.8 g/L 脯氨酸和 0.3 g/L 酸解酪蛋白的培养基中，其愈伤组织的出愈率也为 60.20%；差别不大，分别在加入 2.8 g/L 脯氨酸和 0.3 g/L 酸解酪蛋白以及 2.8g/L 脯

表 1 不同 6-BA 浓度对水稻发芽率与出愈率的影响
Table 1 Effects of different concentrations of 6-BA on the rates of buding and callus induction of rice

水稻品种 Rice variety	6-BA (mg/L)	接种数量 Inoculationnumber	出芽率(%) Buding rate (%)	14 d 后出愈率(%) Callus induction rate after 14 d of inoculation (%)
PC	0	50	96.10±1.10	7.20±0.30
	0.5	50	98.10±1.00	0.00±0.00
	1	50	96.20±1.30	0.00±0.00
	1.5	50	100.00±0.00	3.10±0.10
WT	0	50	100.00±0.00	10.20±0.40
	0.5	50	100.00±0.00	18.10±0.60
	1	50	100.00±0.00	10.20±0.50
	1.5	50	100.00±0.00	8.10±0.30

注: 表 1 中使用的培养基是以基本培养基 M8 的大量元素+微量元素+有机成份为基本培养基, 再添加 2 mg/L 2,4-D, 30 g/L 蔗糖和 8 g/L 琼脂, pH 5.8, 愈伤组织诱导温度(22±2)℃
Note: Medium used in figure 1 was supplemented with 2,4-D 2 mg/L, 30 g/L sugar and 8 g/L agar based on basic medium including the large elements of M8 medium plus trace elements and organic ingredients, pH 5.8, induction temperature at (22±2)℃

表 2 ABA 和 6-BA 对供试水稻发芽率和出愈率的影响
Table 2 Effects of different concentrations of 6-BA and ABA on the rates of buding and callus induction of rice

水稻品种 Rice variety	6-BA (mg/L)	ABA (mg/L)	接种数量 Inoculation number	7 d 发芽率(%) Buding rate after 7 d (%)	出愈率(%) Callus induction rate after 7 d (%)
PC	1.5	1	50±2.00	100.00±0.00	3.50±0.01
	1.5	0	90±3.00	98.10±0.50	0.00±0.00
	0	0	80±3.00	99.10±0.10	0.00±0.00
WT	1.5	1	50±2.00	100.00±0.00	8.20±0.04
	1.5	0	60±2.00	92.10±0.20	0.00±0.00
	0	0	100±3.00	95.10±0.10	3.10±0.02

注: 表 2 中使用的培养基是以基本培养基 M8 的大量元素+微量元素+有机成份为基本培养基, 再添加 2 mg/L 2,4-D, 30 g/L 蔗糖和 8 g/L 琼脂, pH 5.8, 愈伤组织诱导温度(22±2)℃
Note: Medium used in figure 2 was supplemented with 2,4-D 2 mg/L,30 g/L sugar and 8 g/L agar based on basic medium including the large elements of M8 medium plus trace elements and organic ingredients, pH 5.8, induction temperature at (22±2)℃

表 3 单独添加不同 2,4-D 浓度对供试水稻诱导愈伤组织的影响
Table 3 Effects of different concentrations of 2,4-D on the rate of callus induction rates of rice

水稻品种 Rice variety	2,4-D (mg/L)	接种数量 Inoculation number	7 d 出愈率(%) Callus induction rate for 7 d (%)	14 d 出愈率(%) Callus induction rate for 14 d (%)	21 d 出愈率(%) Callus induction rate for 21 d (%)
PC	1	50±2.00	0.00±0.00	0.00±0.00	5.10±0.20
	2	50±2.00	0.00±0.00	0.00±0.00	5.20±0.10
	3	50±3.00	0.00±0.00	6.20±0.30	10.10±0.20
	4	48±2.00	0.00±0.00	10.00±0.20	13.50±0.40
	5	64±3.00	0.00±0.00	9.00±0.30	10.20±0.20
WT	1	50±2.00	0.00±0.00	6.10±0.20	13.20±0.10
	2	66±3.00	0.00±0.00	6.20±0.30	13.30±0.20
	3	40±2.00	13.30±0.20	20.50±0.20	23.40±0.30
	4	40±1.00	10.20±0.10	20.40±0.10	17.10±0.20
	5	48±2.00	0.00±0.00	27.50±0.90	40.40±1.10

注: 表 3 中使用的培养基是以基本培养基 N6 的大量元素+微量元素+有机成份为基本培养基, 再添加 30 g/L 蔗糖和 8 g/L 琼脂, pH 5.8, 愈伤组织诱导温度(22±2)℃
Note: Medium used in figure 3 was supplemented with 30 g/L sugar and 8 g/L agar based on basic medium including the large elements of N6 medium plus trace elements and organic ingredients, pH 5.8, induction temperature at (22±2)℃

表 4 不同激素联合施用对供试水稻出愈率的影响
Table 4 Effects of different concentrations of phytohormone combination on the rates of callus induction of rice

水稻品种 Rice variety	2,4−D (mg/L)	6−BA (mg/L)	ABA (mg/L)	接种数量 Inoculation number	7 d 后的出愈率(%) Callus induction rate after 7 d (%)	14 d 后的出愈率(%) Callus induction rate after 14 d (%)	21 d 后的出愈率(%) Callus induction rate after 21 d (%)
PC	3	1	0	50±1.00	0±0.0	3±0.10	6±0.20
		0	1	50±1.00	0±0.0	3±0.10	6±0.20
		1	1	60±2.00	0±0.0	4±0.10	12±0.40
	4	1	1	30±1.00	0±0.0	2±0.10	11±0.30
WT	3	1	0	50±1.00	0±0.0	4±0.20	10±0.20
		0	1	50±1.00	4±0.2	21±1.10	42±1.30
		1	1	34±1.00	3±0.1	0±0.00	0±0
	4	1	1	54±2.00	4±0.1	2±0.10	8±0.30

注: 表 4 中使用的培养基是以基本培养基 N6 的大量元素+微量元素+有机成份为基本培养基, 再添加 30 g/L 蔗糖和 8 g/L 琼脂, pH 5.8, 愈伤组织诱导温度(22±2)℃
Note: Medium used in figure 4 was supplemented with 30 g/L sugar and 8 g/L agar based on basic medium including the large elements of N6 medium plus trace elements and organic ingredients, pH 5.8, induction temperature at (22±2)℃

表 5 添加有机附加物对供试水稻愈伤组织出愈率的影响
Table 5 Effects of different concentrations of organic substance on the rate of callus induction of rice

水稻品种 Rice variety	2,4−D (mg/l)	ABA (mg/L)	脯氨酸(g/L) Proline (g/L)	水解酪蛋白(g/L) Casein hydrolysate(g/L)	酸解酪蛋白(g/L) Casein acid (g/L)	接种数 Inoculation number	21 d 出愈数量 Callus induction of 21 d	出愈率(%) Callus induction rate (%)
PC	2	0	0	0	0	180±5	89.1±0.3	49.10±0.50
	2	1	0	0	0	170±4	53.2±0.2	31.20±0.20
	2	0	2.8	0.3	0	140±3	117.3±0.5	84.30±0.50
	2	0	2.8	0	0.3	204±5	122.2±0.8	60.20±0.30
WT	2	0	0	0	0	79±2	61.1±0.5	77.20±0.40
	2	1	0	0	0	85±2	53.2±0.4	62.20±0.40
	2	0	2.8	0.3	0	58±2	46.2±0.5	79.20±0.50
	2	0	2.8	0	0.3	86±2	70.2±0.4	81.20±0.30

注: 表 5 中使用的培养基是以基本培养基 N6 的大量元素+微量元素+有机成份为基本培养基, 再添加 30 g/L 蔗糖和 8 g/L 琼脂, pH 5.8, 愈伤组织诱导温度(28±2)℃
Note: Medium used in figure 5 was supplemented with 30 g/L sugar and 8 g/L agar based on basic medium including the large elements of N6 medium plus trace elements and organic ingredients, pH 5.8, induction temperature at (28±2)℃

氨酸和 0.3g/L 水解酪蛋白的培养基上，其愈伤组织出愈率分别为 81.20%和 79.20%，可见添加有机成分不仅可提早启动水稻成熟胚愈伤组织的诱导，而且显著提高了其出愈率，但是不同类型的酪蛋白对不同基因型作用有差异。

1.4 培养温度对供试水稻诱导愈伤组织的影响

表 6 则表明了在不同温度培养下，供试水稻种子的愈伤组织诱导率的变化。在相同组分的水稻成熟胚愈伤组织诱导培养基上，接入供试水稻的种子，分别放置在(22±2)℃、(28±1)℃和(30±1)℃等 3 个温度下培养，21 d 后，其中在(28±1)℃培养的供试水稻的诱导率为 3 种温度设置培养中最高的，WT 的种子可全部诱导出愈伤组织，而 PC 的也高达 92.30%；(30±1)℃的较低，(22±2)℃的最低。而在同一诱导温度下，WT 的出愈率始终比 PC 的高，可见，水稻的基因型对其出愈率的影响仍明显。而种子诱导的最适温度可明显促进供试水稻成熟胚愈伤组织的诱导。但是本文报告的最适培养温度和吕孟雨等报道的有所不同(吕孟雨等, 2005)，分析可能是水稻基因型的不同所致。

1.5 不同琼脂浓度对供试水稻愈伤组织形态的影响

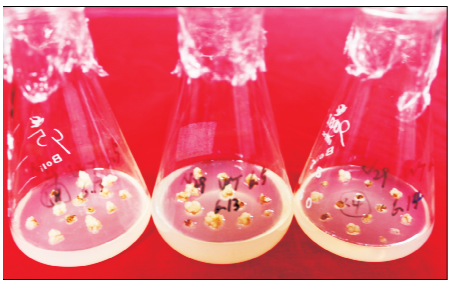
为了诱导出适合悬浮培养的米粒状愈伤组织，进一步将在表 5 中最适培养基组分的培养基上，附加不同浓度的琼脂浓度，观察其诱导的愈伤组织的形态。

表 6 不同温度对供试水稻成熟胚出愈率的影响
Table 6 Effects of different temperature on the rates of callus induction of rice

水稻品种 Rice variety	培养温度(℃) Culture termperature (℃)	接种数目 Inoculation number	21d 后的出愈率(%) Callus induction rate after 21 d (%)
PC	22±2	57±2	42.20±0.50
	28±1	48±2	92.30±0.60
	30±1	48±2	75.20±0.70
WT	22±2	53±3	51.20±0.30
	28±1	48±2	100.00±0.00
	30±1	48±2	94.20±0.40

注: 表 6 中使用的培养基是以基本培养基 N6 的大量元素+微量元素+有机成份为基本培养基, 再添加 2 mg/L 2,4−D, 1 mg/L ABA, 0.3 mg/L 水解酪蛋白, 2.8 mg/L 脯氨酸, 30 g/L 蔗糖和 8 g/L 琼脂, pH 5.8, 愈伤组织诱导温度(28±1)℃
Note: Medium used in figure 6 was supplemented with 2 mg/L 2,4−D, 1 mg/L ABA, 0.3 mg/L casein hydrolysate, 2.8 mg/L proline, 30 g/L sugar and 8 g/L agar based on basic medium including the large elements of N6 medium plus trace elements and organic ingredients, pH 5.8, induction temperature at (28±1)℃

表 7 表明，在 7 g/L 琼脂浓度的诱导培养基上，PC 的愈伤组织生长最快，且诱导出均是适合悬浮培养的米粒状愈伤组织。8 g/L 的琼脂浓度则生长速度则慢于 7 g/L 的琼脂浓度的，愈伤的组织形态与 7 g/L 的琼脂浓度的类似，而琼脂浓度为 9 g/L 的培养基上，不仅愈伤组织生长缓慢，而且诱导的愈伤组织多为湿润且大块的，不适合悬浮培养的继续培养的细胞状态,可见，从生长速度和形态上分析，7 g/L 的琼脂浓度最有利于快速诱导出米粒状的愈伤组织(图 1)。



7 g/L agar　　8 g/L agar　　9 g/L agar

图 1 不同琼脂浓度对供试水稻愈伤组织生长和形态的影响
Figure 1 Effects of different agar concentrations on vegetative state of rice callus

1.6 继代培养对供试水稻愈伤组织生长和形态状态的调节

对于高频水稻悬浮培养体系而言，不仅要求其愈伤组织更分散，更疏松，而且要求愈伤组织有快速的生长能力，因此，水稻成熟胚诱导愈伤组织的继代能力是建立高频和稳定的水稻悬浮培养技术体系的前提和基础。尤其与以水稻幼胚和幼穗为外植体所诱导的愈伤组织比较，成熟胚诱导的更容易褐化，继代培养更困难(方文娟等, 2005)。从表 8 看出，将 WT 种子接种于 M2 的培养基中诱导,其愈伤组织转入继代培养基 M1 (降低了 2,4−D, 增加了 6−BA),可降低褐化率，2 次继代于 M16 的培养基中(再次降低了 2,4−D 和 6−BA 浓度)，则可培养出数量较多且为米粒状的愈伤组织。将 WT 种子接种于 M3 的培养基中诱导，愈伤组织转入继代培养基 M4 (也降低了 2,4−D 和 6−BA 的浓度)，同样可显著降低褐化率，继续降低 2,4−D 和 6−BA 的浓度,可培养出较多米粒状愈伤组织。PC 的继代过程采用类似的方法也可获得较多米粒状愈伤组织，可见，渐次降低 2,4−D 浓度，适当增减 6−BA 的浓度，有利于诱导长出适合水稻悬浮培养的米粒状愈伤组织。

1.7 供试水稻悬浮细胞系的生长曲线

将米粒状且生长均匀的水稻悬浮细胞继代于不同 2,4−D 浓度，溶氧量和新原液比例的培养基中培养，然后测定水稻悬浮细胞的生物量。结果表明：在含有 2 mg/L 2,4−D 的激素下，供试水稻悬浮细胞生物量增殖的最快，表现为其净鲜重和净干重都最大(表 9)。表 10 显示 2:1、3:1 和 4:1 等不同浓度的新原液比例均对悬浮细胞生长有轻微影响，其中新原液比例为 3:1 时，干重累积最高，2:1 时次之，4:1 时最低。表 11 则表明 100 mL 三角瓶中接种 20 mL 的培养液，其中的悬浮细胞生长最快，干重累积最大，两供试材料 PC 和 WT 的表现均类似。

表 7 琼脂浓度对供试水稻愈伤组织生长状态的影响
Table 7 Effects of different concentrations of agar on vegetative callus state of rice

水稻品种 Rice variety	琼脂浓度(g/L) Agar concentration (g/L)	接种数目 Inoculation number	生长率(%) Increment rate (%)	生长形态描述 Vegetative state
PC	7	20±2	55.30±0.50	长大, 分散, 开裂, 米粒状 Larger, dispersed, cracking, particle such as a grain of rice-like
	8	21±1	48.10±0.40	长大, 分散, 开裂 Larger, dispersed, cracking
	9	47±2	51.20±0.40	长大或分散, 开裂, 湿润 Larger or dispersed, cracking, moist
WT	7	40±2	60.10±0.50	分散, 开裂 Cracking
	8	60±3	68.20±0.40	分散, 开裂 Dispersed, cracking
	9	21±2	67.30±0.30	长大, 分散, 开裂, 较干燥 Larger, dispersed, cracking dry

注: 表 7 中使用的培养基是以基本培养基 N6 的大量元素+微量元素+有机成份为基本培养基, 再添加 2 mg/L 2,4−D, 1 mg/L ABA, 0.3 mg/L 水解酪蛋白, 2.8 mg/L 脯氨酸和 30 g/L 蔗糖, pH 5.8, 愈伤组织诱导温度(28±1)℃
Note: Medium used in figure 7 was supplemented with 2 mg/L 2,4−D, 1 mg/L ABA, 0.3 mg/L casein hydrolysate, 2.8 mg/L proline and 30 g/L sugar based on basic medium including the large elements of N6 medium plus trace elements and organic ingredients, pH 5.8, induction temperature at (28±1)℃

表 8 继代培养基对供试水稻愈伤组织生长状况的影响
Table 8 Effects of medium for successive transfer culture on vegetative callus state of rice

水稻品种 Rice variety	一次继代 First subcultu-ring	愈伤接种粒数 Inoculation callus number	褐化率(%) Callus browning rate (%)	二次继代 Second subculturing	总数 Sum	米粒状 Rice-shaped particles
WT	A→M1	20±2	40.20±0.20		0±0	无 None
	B→M1	7±1	29.30±0.20	→M8	7±1	无 None
	D→M1	6±1	33.20±0.20	→M8	6±1	少量 Less
	B→Y1	5±1	40.20±0.30	→M16	5±1	无 None
	C→Y1	29±2	17.10±0.20	→M16	21±1	较多 More
	D→Y1	9±1	22.10±0.20	→M16	12±1	无 None
	B→M4	21±2	29.10±0.30	→M8	12±1	少量 Less
	B→M5	11±1	55.30±0.50	→M16	8±1	少量 Less
	D→M4	14±1	21.10±0.20	→M8	6±1	大米粒, 数量少 Larger size, but less
	D→M5	7±1	29.10±0.20		0±0	无 None
PC	A→M1	23±2	43.20±0.30	→M16	5±1	少量 Less
	A→M1	23±2	43.10±0.50	→M8	11±1	无 None
	B→M1	16±1	56.20±0.10	→M16	8±1	无 None
	D→M1	7±1	43.30±0.40	→M8	10±1	最多 The largest number
	C→Y1	19±2	37.10±0.30	→M16	19±1	较多 The larger number

表 9 不同 2,4−D 浓度对供试水稻悬浮细胞生长的影响
Table 9 Effects of different concentrations of 2,4−D on the rates of growth of rice cell suspensions

2,4-D (mg/L)	体积(mL) Volume (mL)	7 d 后净鲜重(g) Net fresh weight for a week (g)	7 d 后净干重(g) Net dry weight for a week (g)
0.5	15	0.151±0.005	0.005±0.0002
1.0	15	0.312±0.010	0.007±0.0003
1.5	15	0.351±0.018	0.007±0.0003
2.0	15	0.459±0.020	0.009±0.0004

注: 使用的培养基是以基本培养基 N6 的大量元素+微量元素+有机成份为基本培养基, 添加 0.3 mg/L 水解酪蛋白, 2.8 mg/L 脯氨酸和 30 g/L 蔗糖, pH 5.8, 愈伤组织诱导温度(28±1)℃
Note: Medium used in table 9 was supplemented with 0.3 mg/L casein hydrolysate, 2.8 mg/L proline and 30 g/L sugar based on basic medium including the large elements of N6 medium plus trace elements and organic ingredients; pH 5.8, induction temperature at (28±1)℃

1.8 供试水稻悬浮细胞生长曲线的测定

根据本研究适宜的悬浮培养的培养条件，按 3:1 新原液量比例，将 20 mL 培养液接种到 100 mL 的三角瓶中，在 28℃下培养，用于测量悬浮细胞的生长曲线，每隔 2 d 测量一次悬浮细胞的鲜重和干重，共测定了 14 d。图 2 显示了供试水稻悬浮细胞在 14 d 内的细胞培养物鲜重(图 2A)和干重(图 2B)生长变化，2 个供试材料的悬浮细胞干物质累积均呈单峰曲线，接种开始至第 4 d 时，物质累积最快，是悬浮细胞的旺盛生长期，第 4 d 达到峰值，之后干重逐渐下降，生长缓慢，可见，该水稻悬浮细胞的生长周期为 7 d，而 PC 和 WT 的生长曲线表现类似。

2 讨论

2.1 水稻成熟胚诱导愈伤组织技术的建立是水稻稳定高效悬浮细胞系建立前提

基因型的差异是水稻成熟胚愈伤组织培养力差异的内在因素(阎丽娜等, 2010)。本研究表明，在不同的培养基、琼脂和激素的调节下，WT 的出愈率始终要高于 PC 的，这与其种子的发芽率有一定相关。PC 的活力比 WT 的低，而且其成熟胚的出愈率也低，可见，基因型的选择是其组织培养力的发挥的重要因素，而选择新收获的发芽率较高水稻种子也有利于愈伤组织的高频诱导。

培养温度是诱导植物愈伤组织关注的重要环境条件，不同水稻材料成熟胚愈伤诱导所需的适宜温度有差异，过高或者过低温度均适合其愈伤组织的诱导和快速增加(吕孟雨等, 2005)。本研究表明：当培养温度低于 25℃时，水稻愈伤组织诱导率极低

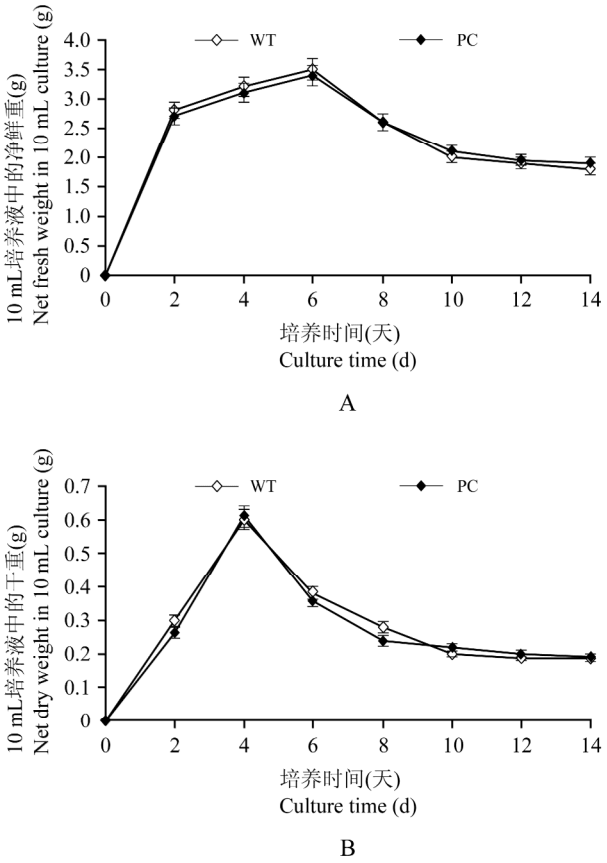


图 2 水稻悬浮细胞生长曲线
Figure 2 The growth curve of embryogenic cell suspensions of rice

且愈伤组织生长缓慢，而大于 32℃时，虽诱导率有所提高，但是愈伤组织也加快生长，但是愈伤组织多呈水渍、絮状和大颗粒，容易褐化，不利于继代。只有 28℃左右培养时，其不但愈伤组织的诱导率最高，而且愈伤组织生物量增长也最快，尤其是其愈伤组织的形态呈小颗粒状，分散且疏松，多次继代，

表 10 不同新原液比对供试水稻悬浮细胞生长的影响
Table 10 Effects of different fresh and culture fluid combination on the cell suspension growth of rice

新原液比 Proportion	新液量(mL) Fresh fluid volume (mL)	原液量(mL) Culture fluid volume (mL)	10 mL 净鲜重(g) Net fresh weight of 10 mL (g)	10 mL 净干重(g) Net dry weight of 10 mL (g)
2:1	40	20	0.230±0.001	0.015±0.0007
3:1	45	15	0.241±0.001	0.016±0.0006
4:1	48	12	0.214±0.001	0.014±0.0004

注: 表 10 中使用的培养基是以基本培养基 N6 的大量元素+微量元素+有机成份为基本培养基, 再添加 2 mg/L 2,4−D, 0.3 mg/L 水解酪蛋白, 2.8 mg/L 脯氨酸和 30 g/L 蔗糖, pH 5.8, 愈伤组织诱导温度(28±1)℃
Note: Medium used in figure 10 was supplemented with 2 mg/L 2,4−D, 0.3 mg/L casein hydrolysate, 2.8 mg/L proline and 30 g/L sugar based on basic medium including the large elements of N6 medium plus trace elements and organic ingredients, pH 5.8, induction temperature at (28±1)℃

表 11 溶氧量对供试水稻悬浮细胞生长的影响
Table 11 Effects of dissolved oxygen on the rates of the cell suspension growth of rice

新原液比 Proportion	接种量(mL) Inoculation (mL)	新液量(mL) Fresh fluid volume (mL)	原液量(mL) Culture fluid volume (mL)	10 mL 净鲜重(g) Net fresh weight of 10 mL (g)	10 mL 净干重(g) Net dry weight of 10 mL (g)
2:1	10	7	3	0.188±0.009	0.011±0.004
	20	13	7	0.407±0.015	0.176±0.007
	30	20	10	0.130±0.006	0.010±0.003

注: 表 11 中使用的培养基是以基本培养基 N6 的大量元素+微量元素+有机成份为基本培养基, 再添加 2 mg/L 2,4−D, 0.3 mg/L 水解酪蛋白, 2.8 mg/L 脯氨酸和 30 g/L 蔗糖, pH 5.8, 愈伤组织诱导温度(28±2)℃
Note: Medium used in figure 11 was supplemented with 2 mg/L 2,4−D, 0.3 mg/L casein hydrolysate,2.8 mg/L proline and 30 g/L sugar based on basic medium including the large elements of N6 medium plus trace elements and organic ingredients, pH 5.8, induction temperature at (28±2)℃

愈伤组织不褐化，其继代能力最强。所以，本研究中适合供试水稻高频诱导愈伤组织且易于诱导出米粒状、疏松和分散形态的愈伤组织的最适培养温度在 28℃左右，可见，28℃为水稻成熟胚来源诱导的愈伤组织建立水稻悬浮培养技术的适宜温度。

不少研究表明，在水稻成熟胚愈伤组织诱导的培养基中添加一些小分子有机营养物质如氨基酸类，可显著提高其愈伤组织的诱导率以及增加其生物量累积(胡燕梅等, 2010; 李霞等, 2005b)。在本研究中，在采用 N6 基本培养基为主要成分的愈伤组织诱导中，附加一定浓度的激素组合，进一步添加 2.8 mg/L 脯氨酸和 0.3 mg/L 水解酪蛋白等有机营养物质，对供试水稻愈伤组织诱导率的提高以及愈伤组织形态的调控有明显的促进作用，WT 和 PC 的均可提高 2~3 倍的愈伤组织诱导率。

2.2 渐次降低继代培养的外源激素浓度是培养分散和颗粒状水稻愈伤组织的关键

外源激素是调节水稻愈伤组织形态的重要手段，但是不同水稻材料需要的激素水平不同。本研究表明：虽然 2 个供试材料成熟胚愈伤组织诱导的最适培养基成分不同，但在继代培养中，2 个供试水稻材料均在原有愈伤组织诱导培养基组分的基础上，均逐渐降低 2,4−D 和 6−BA 浓度，均可诱导出米粒状、疏松且生长迅速的愈伤组织，最终有利于快速培养出生长旺盛且均匀的细胞团和单细胞层，建立高效稳定的水稻悬浮细胞培养体系。而将 2 材料的疏松的米粒状愈伤组织转移到液体培养基中的生长，2 材料对激素、新原液比以及溶氧量等则差异不大，均在 42 d 即可诱导出分散和米粒状的水稻悬浮细胞系。2 材料悬浮细胞系的生长特征也差异不大，生长周期均为 7 d，接种至第 4 d，悬浮细胞生物量增加最快，不论是鲜重还是干重增加明显，其生长最旺盛，到培养的第 4 d 时，生物量达到最大值，而到第 6 d 生物量累积缓慢，干重增加放缓(王满, 2011)。因此，在继代培养基中，通过外源激素的降低逐渐调节水稻愈伤组织的激素水平，均诱导出的

米粒状且分散的愈伤组织，这是水稻悬浮细胞培养技术的关键和难点。本研究建立了供试水稻材料的悬浮细胞培养技术，该技术水稻悬浮细胞培养 7 d 为一个生长周期，第 3~4 d，物质累积最大。该技术的建立，可用于深入研究转 C_4 *pepc* 基因水稻高光效的分子机理。

3 实验材料与方法

3.1 实验材料

实验使用的水稻材料为高表达玉米 C_4 型光合酶基因 *pepc* 水稻(PC)和未转基因的野生型 Kitaake (W-T)，分别保存在江苏省农业科学院内(李霞等, 2001)。

3.2 培养基的配置

3.2.1 水稻愈伤组织诱导的培养基

本研究采用的基本培养基为 M8 和 N6，按其大量元素、微量元素及其有机成分的比例配制，其中 M8 参照梅传生等方法(梅传生等, 1988)，琼脂浓度为 8 g/L，蔗糖浓度为 30 g/L；设置附加 0~5 mg/L 的 2,4−D; 0~1 mg/L 脱落酸(absciss acid, ABA); 0~3 mg/L 6−苄基氨基嘌呤(6−BA)，pH 5.8，在 120℃下高压灭菌 20 min。

3.2.2 水稻愈伤组织继代的培养基

水稻愈伤组织继代培养基是参照 N6 的基本成分配制，蔗糖浓度为 30 g/L，添加不同浓度的 2,4−D、A-BA、6−BA 和细胞分裂素(KT)等，琼脂浓度配置 3 个浓度，分别为 7 g/L、8 g/L 和 9 g/L，pH 为 5.8，在 120℃下高压灭菌 20 min。

3.2.3 水稻悬浮培养的液体培养基

基本培养采用 N6 的大量、微量元素及有机成分配置，并添加的蔗糖浓度为 30 g/L，琼脂为 8 g/L，脯氨酸为 2.8 g/L，水解酪蛋白为 0.3 g/L，2,4−D 浓度为 2 mg/L，pH 5.8，在 120℃高压灭菌 20 min。

3.2.4 供试水稻成熟胚愈伤组织的诱导

参照李霞等(2005b)方法，将供试水稻成熟种子去种壳，经 75%乙醇浸泡，表面消毒 5 min，弃去该消毒液，再用 0.1%升汞溶液浸泡 15 min，再弃该消毒液，最后用无菌水冲洗 4 次，放入(28±2)℃培养室过夜，次日再用 70%乙醇浸泡，以进行第二次表面消毒，5 min 后弃该消毒液，之后用 0.1%升汞溶液浸泡，5 min 后弃该消毒液，最后用无菌水冲洗 4 次。将消毒的稻种分别接种到不同的诱导培养基中，以上操作均在无菌的超净工作台进行，然后，接种好的培养基分别放在不同的培养温度下，暗培养 30 d．统计愈伤数，计算诱导率。

3.2.5 供试水稻成熟胚愈伤组织的继代培养

将上述供试水稻材料成熟胚诱导的愈伤组织，转移到继代培养基上，继代培养基的成分见表 12，在(28±2)℃暗培养，隔 7 ds 继代 1 次，记录供试水稻材料愈伤组织的生长情况。

3.2.6 供试水稻悬浮细胞培养系的建立

按照王满(2011)的方法，挑选继代培养中米粒状、疏松且分散的愈伤组织块约 3 g，转接到 100 mL 容积为 250 mL 的三角瓶的液体培养基中，放在恒温摇床上，进行培养，培养温度为(28±2)℃，摇床转速(110±10) rpm。培养第 7 d 后，进行第一次液体培养基的继代培养，除去较大颗粒的细胞团，保留 1/3 的培养原液以及 1 mm 直径的愈伤组织颗粒，再补充新鲜培养液到 100 mL，以相同的培养温度和转速培养，每 7 d 转接新鲜的培养基，继代培养 1 次。当继代 6 次以后，就可建立高频和稳定的水稻悬浮细胞技术体系。

3.2.7 水稻悬浮细胞生长曲线的测定

将得到均一水稻悬浮细胞，称取等质量的水稻悬浮细胞培养物，分别转接于含有不同 2,4 的培养基，分别称量不同时间培养的水稻悬浮细胞鲜重。并将等质量的水稻悬浮细胞，移入同样体积的三角瓶中，培养液总体积为 10 mL、20 mL 和 30 mL，初步确定供试水稻悬浮细胞生长的最适溶氧量。在水稻悬浮细胞液总体积相同的条件下，再加入不同比例的新原液比例，确定供试水稻悬浮细胞生长的最适新原液比例。供试水稻悬浮细胞的鲜重，则均通过低温离心，搜集不同培养时间的水稻悬浮细胞培养物，然后测量其鲜重，然后再放入鼓风干燥箱内，在 120℃杀青 20 min 后，在 80℃烘干为恒重，再称其干重，确定适宜的新原液比例，最后在适宜的培养条件下，绘制供试水稻材料培养细胞的生长曲线。

作者贡献

王满和石牡丹是本研究的实验设计和实验研究的执行人；王满及钱宝云完成数据分析，论文初稿的写作；魏晓东和方先文参与实验设计，试验结果分析；李霞是项目的构思者及负责人，指导实验设计，数据分析，论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

表 12 不同培养基组分(王满, 2011)
Table 12 Components in the different mediums (Wang, 2011)

培养基编号 Number of medium	培养基类型 Type of medium	培养基组分 Components of medium
A	诱导培养基	M8+2 mg/L 2,4−D+1 mg/L ABA+8 g/L Agar+30 g/L sugar
B	Induction medium	M8+2 mg/L 2,4−D+0.5 mg/L 6−BA+1 mg/L ABA+8 g/L Agar+30 g/L sugar
C		M8+2 mg/L 2,4−D+1 mg/L 6−BA+1 mg/L ABA+8 g/L Agar+30 g/L sugar
D		M8+2 mg/L 2,4−D+1.5 mg/L 6−BA+1 mg/L ABA+8 g/L Agar+30 g/L sugar
M1	继代培养基	M8+1 mg/L 2,4−D+2 mg/L 6−BA+1 mg/L ABA+8 g/L Agar+30 g/L sugar
Y1	Subculture medium	M8+1 mg/L 2,4−D+1 mg/L 6−BA+0.3 mg/L KT+8 g/L Agar+30 g/L sugar
M4		N6+1 mg/L 2,4−D+1 mg/L 6−BA+8 g/L Agar+30 g/L sugar
M5		N6+2 mg/L 2,4−D+1 mg/L 6−BA+8 g/L Agar+30 g/L sugar
M16		M8+0.5 mg/L 2,4−D+0.2 mg/L 6−BA+1 mg/L ABA+8 g/L Agar+30 g/L sugar
M8		M8+1 mg/L 2,4−D+0.5 mg/L 6−BA+0.5 mg/L ABA+8 g/L Agar+30 g/L sugar
M2		M8+2 mg/L 2,4−D+1 mg/L 6−BA+1 mg/L ABA+8 g/L Agar+30 g/L sugar
M3		M8+2 mg/L 2,4−D+1.5 mg/L 6−BA+1 mg/L ABA+8 g/L Agar+30 g/L sugar
M6		M8+1 mg/L 2,4−D+0.5 mg/L 6−BA+0.5 mg/L ABA+8 g/L Agar+30 g/L sugar
M7		M8+2 mg/L 2,4−D+1 mg/L 6−BA+1 mg/L ABA+8 g/L Agar+30 g/L sugar
M8		M8+1 mg/L 2,4−D+2 mg/L 6−BA+1 mg/L ABA+8 g/L Agar+30 g/L sugar

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(30871459)和江苏省自主创新课题[CX(11)1020]共同资助。

参考文献

Bandyopadhyay A., Datta K., Zhang J., Yang W., Raychaudhuri S., Miyao M., and Datta S.K., 2007, Enhanced photosynthesis rate in genetically engineered *indica* rice expressing *pepc* gene cloned from maize, Plant Sci., 172(6): 1204-1209 http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.02.016

Chen P.B., and Li X., 2012, Promotion of photosynthesis of transgenic rice plant with overexpressing C_4 *pepc* from maize under low concentration NO, Zhiwu Yanjiu (Bulletin of Botanical Research), 32(4): 402-409 (陈平波, 李霞, 2012, 低浓度NO对高表达转玉米C_4型*pepc*水稻光合的促进, 植物研究, 32(4): 402-409)

Chen Z., Chen J.H., Bian L.M., Li T.T., Wu C., and Shi J.S., 2007, Establishment of embryogenic callus suspension culture system in Liriodendron hybrids, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 5(1): 137-140 (陈志, 陈金慧, 边黎明, 李婷婷, 吴淳, 施季森, 2007, 杂交鹅掌楸胚性细胞悬浮系的建立, 分子植物育种, 5(1): 137-140)

Fang W.J., Han L.B., and Zeng H.M., 2005, Research advances in factors affecting establishment of plant cell suspension culture, Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Information), (5): 11-15 (方文娟, 韩烈保, 曾会明, 2005, 植物细胞悬浮培养影响因子研究, 生物技术通报, (5): 11-15)

Hu Y.M., Guo Y.G., Jiang X.W., Yu Q.D., and Cui P., 2010, Effect of sucrose and natural organic affixtures on flavonoids biosynthesis of Ginkgo Callus, Xinan Nongye Xuebao (Southwest China Journal of Agricultural Sciences), 23(3): 690-693 (胡燕梅, 郭云贵, 蒋细旺, 余群娣,崔鹏, 2010, 蔗糖及天然有机物对银杏愈伤组织合成黄酮的影响, 西南农业学报, 23(3): 690-693)

Ku M.S., Agarie S., Nomura M., Fukayama H., Tsuchida H., Ono K., Hirose S., Toki S., Miyao M., and Matsuoka M., 1999, High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants., Nat. Biotechno1., l7: 76-80

Li X., Wu S., Jiao D.M., Wang S.H., Li C.Q., and Ku M.S.B., 2001, Selection and breeding of the *pepc* transgenic rice, Jiangsu Nongye Xuebao (Jiangsu Journal of Agricultural Sciences), 17(3): 143-147 (李霞, 吴爽, 焦德茂, 王守海, 李成荃, 古森本, 2001, 转*pepc*基因水稻的选育, 江苏农业学报, 17(3): 143-147)

Li X., Jiao D.M., and Dai C.C., 2005a, The Response to photooxidation in leaves of *PEPC* transgenic rice plant (*Oryza sativa* L.), Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica), 31(4): 408-413 (李霞, 焦德茂, 戴传超, 2005a,

转PEPC基因水稻对光氧化逆境的响应, 作物学报, 31(4): 408-413)

Li X., Chen T., and Zhou Y.L., 2005b, The comparison in tissue culture ability from mature embryo in *Indica* and *Japonica* rice cultivars, Nanjing Shida Xuebao (Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition)), 28(4): 103-108 (李霞, 陈婷, 周月兰, 2005b, 籼粳稻成熟胚愈伤组织培养力的比较, 南京师大学报(自然科学版), 28(4): 103-108)

Li X., and Jiao D.M., 2005, Transgenic rice overexpressing C_4 photosynthetic genes and their application in breeding, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 3(4): 550-556 (李霞, 焦德茂, 2005, 转C_4光合基因水稻及其在育种中的应用, 分子植物育种, 3(4): 550-556)

Li X., Zhao Y.T., Yan L.N., and Zhou Y.L., 2008, Comparison in tissue culture power between anther in indica rice Yangdao 6 and Japonica rice Suhuxiangjing, Nanjing Shifan Daxue Xuebao (Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition)), 31(4): 108-113 (李霞, 赵赟涛, 阎丽娜, 周月兰, 2008, 籼稻扬稻6号和粳稻苏沪香粳花药培养力的比较, 南京师范大学报(自然科学版), 31(4): 108-113)

Li X., Wang C., and Ren C.G., 2011, Effects of 1-butanol, neomycin and calcium on the photosynthetic characteristics of *pepc* transgenic rice, Afri. J. Biotechnol., 10(76): 17466-17476

Li X., and Ren C.G., 2012, Effects on photosynthetic and fluorescence characteristics under treatments of ABA, BA or DPI in the transgenic rice with over-expression C_4 *pepc* gene, Zhiwu Shengli Xuebao (Plant Physiology Journal), 48(6): 549-556 (李霞, 任承钢, 2012, ABA, BA及DPI对高表达玉米C_4 *pepc*基因的水稻光合特性及叶绿素荧光特性的影响, 植物生理学报, 48(6): 549-556)

Lv M.Y., Zhao H., and Wang H.B., 2005, Study on the growth rate of rice callus, Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin), 21(12): 53-55 (吕孟雨, 赵和, 王海波, 2005, 水稻愈伤组织生长速率研究, 中国农学通报, 21(12): 53-55)

Mei C.S., Zhang J.Y., and Wu G.N., 1988, Improving regeneration rate of anther culture in Indica rice (*Oryze sative* L. Subsp. *indica*), Jiangsu Nongye Xuebao (Jiangsu Journal of Agricultural Sciences), 4(2): 45-48 (梅传生, 张金渝, 吴光南, 1988, 籼稻花培绿苗率的提高, 江苏农业学报, 4(2): 45-48)

Ren C.G., and Li X., 2010, Effect of exogenous H_2O_2 on photosynthetic characteristics in *PEPC* transgenic rice, Huabei Nongxuebao (Acta Agriculturae Boreali-Sinica), 25(4), 130- 135 (任承刚, 李霞, 2010, 外源H_2O_2对孕穗期转C_4 *pepc*水稻及原种光合特性的影响, 华北农学报, 25(4): 130-135)

Wang M., and Li X., 2009, Advances in cell suspension culture of rice, Fenzi zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 7(6): 1200-1206 (王满, 李霞, 2009, 水稻悬浮培养研究进展, 分子植物育种, 7(6): 1200-1206)

Wang M., 2011, Effects of elicitors on signal molecular and *PEPCase* in suspension-cultured cells of transgenic rice with C_4 *pepc* from maize, Thesis for M.S., College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University Nanjing, Supervisor: Li X., and Cai Q.S., pp.13-28 (王满, 2011, 外源因子对高表达转玉米C_4型*pepc*水稻悬浮细胞中*PEPCase*及内源信号分子的影响, 硕士学位论文, 南京农业大学生命科学院, 导师: 李霞, 蔡庆生, pp.13-28)

Wu C.X., 2009, Influencing factors on the culturing of plant suspension cell, Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agricultural Sciences), 37(1): 36-38 (吴春霞, 2009, 植物细胞悬浮培养的影响因素, 安徽农业科学, 37(1): 36-38)

Yan L.N., Li X., and Wu D., 2010, The comparison in tissue culture ability from mature embryo in different rice cultivars, Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica), 43(6): 1127-1135 (阎丽娜, 李霞, 吴丹, 2010, 不同类型水稻材料成熟胚组织培养力的比较, 中国农业科学, 43(6): 1127-1135)

Yuan J.L., Zhang D., Gu X.P., Yue J.J., and Chen Y.T., 2009, Suspension culture optimization of seed embryo callus from Bambusa multiplex, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 7(4): 839-844 (袁金玲, 张朵, 顾小平, 岳晋军, 陈益泰, 2009, 孝顺竹种胚愈伤组织悬浮培养条件优化, 分子植物育种, 7(4): 839-844)

Zhang B.J., Hua C., Zhou F., Zhou Q.C., Chen Q.Z., Wang R.F., and Jiao D.M., 2008, Photosynthetic characteristics of transgenic rice with *PEPC+PPDK* gene, Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica), 41(10): 3008-3014 (张边江, 华春, 周峰, 周泉澄, 陈全战, 王荣富, 焦德茂, 2008, 转*PEPC+PPDK*双基因水稻的光合特性, 中国农业科学,41(10): 3008-3014)

Zhou B.Y., Ding Z.S., and Zhao M., 2011, Alleviation of drought stress inhibition on photosynthesis by overexpression of *PEPC* gene in rice, Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica), 37(1): 112-118 (周宝元, 丁在松, 赵明, 2011, *pepc*过表达可以减轻干旱胁迫对水稻光合的抑制作用, 作物学报, 37(1): 112-118)