

## ABA 对水稻愈伤组织、不定胚发育及其植株再生的影响

姜 华<sup>1,\*</sup> 陈 静<sup>1,\*</sup> 高晓玲<sup>1</sup> 万 佳<sup>1</sup> 王平荣<sup>1</sup> 汪旭东<sup>1,3,\*\*</sup> 徐正君<sup>1,3,\*\*</sup>

(<sup>1,†</sup> 四川农业大学水稻研究所, 四川温江 611130; <sup>2,†</sup> 山东轻工业学院食品与生物工程学院; <sup>3,†</sup> 作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室, 四川雅安 6250142)

**摘 要:** 以长期培养的水稻愈伤组织为材料,用不同浓度的 ABA 对其进行了前处理,对愈伤组织的结构变化、植株再分化率、不定胚和器官分化的形成进行了研究。结果表明,经 10 mg/L ABA 前处理的愈伤组织外缘部分表现出禾本科类不定胚形成前期的形态结构,10 mg/L ABA 预处理不仅能使分化时间缩短 1 周,而且使植株再生率明显提高,说明 ABA 对细胞再分化进程有明显的促进作用。

**关键词:** 水稻;ABA;愈伤;再生;不定胚

**中图分类号:** S511

## Effect of ABA on Rice Callus and Development of Somatic Embryo and Plant Regeneration

JIANG Hua<sup>1,2,\*</sup>, CHEN Jing<sup>1,\*</sup>, GAO Xiao-Ling<sup>1</sup>, WAN Jia<sup>1</sup>, WANG Ping-Rong<sup>1</sup>, WANG Xu-Dong<sup>1,3,\*\*</sup> and XU Zheng-Jun<sup>1,3,\*\*</sup>

(<sup>1,†</sup> Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, Sichuan; <sup>2,†</sup> Department of Food and Bioengineering, Shandong Institute of Light Industry, Jinan 250100, Shandong; <sup>3,†</sup> Key Laboratory of Crop Genetic Resources and Improvement Ministry of Education, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China)

**Abstract:** It has been reported that ABA can promote the development of somatic embryo and increase the ratio of regenerated plantlet in rice callus. But, little has been reported about the mechanism of ABA on improving the ratio re-differentiation of rice callus so far, and especially about middle-process from re-differentiation cells to regenerate plantlet. Present study indicated that ABA can affect the structure of rice callus and make it compact, color yellow and the granule obvious, but it has not relation to the ratio of callus formation. That the ratio of plantlet re-differentiation declined dramatically has been a general knowledge for the long-time cultured rice callus, and this is one of the main problems for some researchers. Improving the ratio of rice callus to plantlet not only brought along the research of transgenic rice plant, but also had positive roles on related research. In this research, we treated the long-time subcultured rice callus with different concentration of ABA, and observed the structure of callus, the differentiation of somatic embryo and rice organs and investigated the ratio of plantlet regeneration. The result indicated that after the long-time subcultured callus were treated with 10 mg/L ABA, the exterior structure of the callus showed some characters that just similar to that the development prophase of the somatic embryogenesis in graminaceae (Fig.1). And not only the plant regeneration period was shortened about 1 week, but also the percentage of plant regeneration from callus-mass was increased, indicating that ABA can promote differentiation process of cells (Table 1). Also, the ratio of regenerated plants developing from somatic embryo was increased by ABA pretreatment (Table 2). These results suggested that ABA might stimulate the processes of callus differentiation, promote the plant regeneration and the development of somatic embryo, and reduced the shoot organ formation from the callus differentiation.

**Key words:** Rice; ABA; Callus; Regeneration; Somatic embryo

**基金项目:** 四川省国际合作项目(05GH0001)、教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT0453)和四川省青年科技基金项目。

**作者简介:** 姜华(1974-),男,山东寿光人,博士。\* 同等贡献。

\*\* 通讯作者(Corresponding authors): 汪旭东; 徐正君(1964-),研究员,博士生导师,主要从事水稻逆境研究与基因克隆分析, E-mail: zhengjunxu@hotmail.com † 为共同第一单位。

Received(收稿日期): 2005-11-02; Accepted(接受日期): 2006-01-06.

早在1974年 Ammirato 就报道了 ABA 可促进葛缕子体细胞胚胎发育<sup>[1]</sup>。杨跃生等<sup>[2]</sup>在改良水稻原生质体愈伤组织再生植株的几个不同培养基中发现,所有添加 ABA 的培养基中再生苗数量明显高于对照。张栋等<sup>[3]</sup>将水稻再生愈伤组织经 ABA + NAA 诱导处理,发现处理较对照有明显的变化。这些都说明 ABA 对诱导胚性水稻愈伤组织有重要的作用。一般认为,ABA 对于出愈率没有影响,仅使愈伤组织的结构紧密、颜色淡黄及颗粒状更加明显<sup>[4-6]</sup>。到目前为止,关于 ABA 对提高愈伤组织再分化率机制的研究较少<sup>[7]</sup>,特别对水稻培养细胞再分化后发育成植株的中间过程研究很少。对于长期(90 d 以上)培养的水稻愈伤组织来说,植株再生分化率急剧下降已成为一种常识<sup>[8]</sup>,也是长期困扰研究者的主要问题之一。提高水稻愈伤组织的植株分化率,不仅对水稻转基因等研究起带动作用,也对相关研究产生积极影响。本研究从激素平衡角度考虑,借鉴前人的研究经验,用不同浓度 ABA 处理长期培养的水稻愈伤组织,从愈伤组织的结构、植株再分化率,以及对不定胚和器官分化的形成等方面进行了观察,试图为提高水稻愈伤组织的植株再生分化率做一些探索,也为深入研究 ABA 对于培养细胞的影响提供一定的依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 愈伤组织的诱导与处理

成熟水稻种子 Yuhkara (*Oryza sativa* L.) 去壳,用 70% 的酒精处理 2~3 min,纯净水冲洗 3 次再用 0.5%~1% 次氯酸钠消毒处理 30 min,无菌水冲洗 4~5 次后接种于含 2 mg/L 2,4-D 的诱导培养基 (MSB5, 3% 蔗糖, 0.8% Casamino acid, pH 5.7~5.8), 28 d 后在相同培养基上继代培养,每 30 d 继代 1 次,连续继代培养 180 d。然后,将愈伤组织移植到前处理培养基 (MSB5, 0~12 mg/L ABA, 2 mg/L 2,4-D, 3% 蔗糖, pH 5.7~5.8) 培养 21 d。接着移植到无激素添加的分化培养基 (MSB5, 3% 蔗糖, 0.8% Casamino acid, pH 5.7~5.8) 处理 2~3 d,再接种于分化培养基 (MSB5 + 3.5 mg/L KT + 0.25 mg/L NAA), 于 25℃、16 h 光照再生培养。

### 1.2 石蜡切片的制作

石蜡切片的制作参照李正理的方法<sup>[9]</sup>,略有改进。切片材料为 10 mg/L ABA 处理的愈伤组织 (21 d 培养) 和对照,以及有绿点 (green spot) 出现的愈伤组

织 (再生培养基中培养 7~10 d)。Olympus BH-2 显微镜下观察并照相。

### 1.3 再生植株的观察

当再生培养中愈伤组织长出约 2~3 mm 绿色幼芽时,将愈伤组织放在解剖镜下,用镊子和解剖刀的刀背细心剥离幼芽及根周围的愈伤组织,观察幼芽与根是否在同一轴心上,以判断再生植株是否来源于不定胚或器官分化。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织内部结构的差异

如图 1 所示,对照 (A) 与处理 (B) 差异明显。未经处理的愈伤组织,表层细胞染色较深、细胞较小,而内部细胞染色较浅、细胞较大。说明其外部细胞处于不断分裂状态而内部细胞相对稳定 (Fig. 1-A)。与之相比,经 ABA 处理后的愈伤组织,表层局部染色较深,细胞更小,并且成块,预示这些细胞块可能发生分化,如 Fig. 1-B 箭头所示,这类细胞块与禾本科不定胚发育前期的形态相似。对照与处理的差异说明 ABA 可能在细胞分化过程中起某种促进作用,导致细胞发育进程的差异。但是,关于 ABA 促进细胞分化的机制,目前还不明确<sup>[7,10]</sup>。

### 2.2 ABA 前处理对植株再生的影响

从表 1 可以看出,在前处理培养基中添加 4~12 mg/L ABA,植物体再生分化率增加,绿芽形成时间缩短。2~4 mg/L ABA 处理,再分化率和绿芽形成的时间就发生变化,但当浓度增加到 8~12 mg/L 时,再生分化率明显提高,为对照的 2~3 倍,同时绿芽形成速率为对照的 1.4~2 倍。当 ABA 浓度为 10 mg/L 时,其再生分化率和绿芽形成速率均为最高。同时不定芽形成的时间最短,比对照缩短 1 周左右。当 ABA 浓度继续加大到 12 mg/L 时,再生分化率降低,形成绿芽的时间与 10 mg/L ABA 的前处理相同。这暗示 ABA 在愈伤组织的再分化及芽的形成过程中起调节作用。2 mg/L ABA 处理反而比对照差的原因,可能来自实验误差,主要是有些被杂菌感染所致。

### 2.3 ABA 对不定胚和茎叶分化的石蜡切片观察

对于 10 mg/L ABA 前处理后再生培养的愈伤切片组织,图 2-A 表明不定胚是上部有芽分化 (a) 和下部有根分化 (c) 的分生组织,芽分化外侧有类子叶鞘组织覆盖,在芽分化和根分化之间有类似维管束的结构 (b) 相连,不定胚发育的特殊性可能为芽与根发

育成植株后在同轴线提供了可能。而茎叶(图 2-B)分化的结构中只有芽的雏形(箭头)而没有根分化,更观察不到类似维管束的结构,可能导致植株再生

后的芽分化速度快于根的分化,而且,根生长的位置也是随机的,再生后的植株形态表现出芽与根不在同轴线的可能性更高。

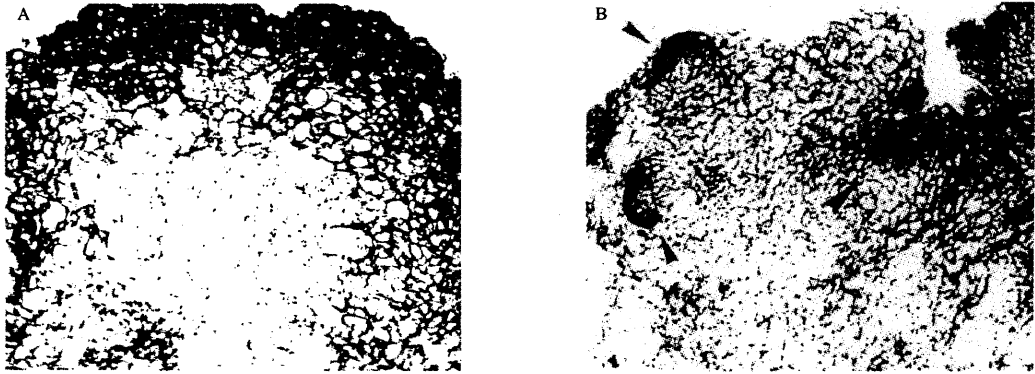


图 1 不同处理的水稻愈伤组织石蜡切片

Fig.1 Paraffin sections of the subcultured callus and ABA-treated callus from rice

A: 继代培养(180+21)d 的愈伤组织切片; B: 继代培养 180 d 后,在含有 10 mg/L ABA 的继代培养基上继代培养 21 d 的愈伤组织切片。

A: Callus successively cultured for (180+21) days on subculture medium; B: After subculturing callus for 180 days, the callus was cultured for 21 days on the medium containing 10 mg/L ABA.

表 1 ABA 前处理对长期继代培养愈伤的再分化效果

Table 1 Effect of ABA pre-treatment on plantlet regeneration from long-term cultured rice callus

前处理 ABA 浓度 Pretreatment ABA concentration (mg/L)	再生植株 Plantlets regeneration			
	愈伤组织数 Number of callus	植株再生 <sup>a</sup> Plant regenerated(%) <sup>a</sup>	愈伤成苗数 <sup>b</sup> Shoots per callus-mass <sup>b</sup>	形成绿芽的天数 <sup>c</sup> Days to 1 mm green shoot <sup>c</sup>
0	50	11.82 ± 2.23	2.65 ± 0.37	18
2	39	10.70 ± 2.51	3.21 ± 0.54	20
4	50	16.19 ± 1.07	2.34 ± 0.26	17
6	50	19.44 ± 2.34	3.50 ± 0.33	15
8	50	27.52 ± 3.72	3.91 ± 0.48	15
10	50	39.74 ± 5.31	5.22 ± 0.52	11
12	50	27.50 ± 4.65	5.48 ± 0.45	11

注: a = 绿色植株愈伤/愈伤总数 × 100%; b = 植株再生茎数/再生植株愈伤总数; c: 从再分化培养到绿色茎长度 1 mm 的时间。

Notes: a = (callus masses of green plantlet/total callus masses transplanted) × 100; b = shoots of plantlet regenerated /callus masses of plantlet regenerated;

c: shows the days from callus transplantation to regeneration of green shoots over 1 mm.



图 2 胚和器官发育的石蜡切片

Fig.2 Paraffin sections of somatic embryo and/or shoot organogenesis

A: 来自绿化愈伤的不定胚切片; B: 来自绿化愈伤的茎叶分化切片。用 10 mg/L ABA 进行 21 d 预处理的愈伤组织被用于再生培养。

A: the structure of somatic embryo from green-spot callus; B: the structure of shoot organogenesis from green-spot callus.

Callus cultured for 21 days with 10 mg/L ABA, were used in the regeneration culture.

## 2.4 ABA 对不定胚和茎叶分化的影响

ABA 能够提高植物体的再生分化效率,并且对于由不定胚和茎叶分化而来的芽与根的影响差异较大。为了调查 ABA 对再生分化效率提高的原因,我们通过绿芽与根的空间分布推测绿芽是源于不定胚的形成还是源于茎叶分化的形成。试验中使用继代培养 180 d 的愈伤组织,以无 ABA 处理 21 d 作为对照,通过再生植株的特征观察了 10 mg/L ABA 前处理 21 d 对不定胚和茎叶分化的影响效果。结果在

对照区与处理区都发现部分植株的芽和根出现在同轴线的现象,而且在绿芽出现 2 d 后左右根也相继出现,可以推测主要是由不定胚再生而来的植株;而另一部分的再生植株,芽与根不在同一轴线,芽出现 6 d 后左右根才能被观察到,此时仍有大量愈伤组织没有分化出根,可以推测这部分再生植株主要是由茎叶分化而来的。于是,我们统计了它们的比例。如表 2 所示,ABA 前处理可以提高不定胚类的再生植株比例。

表 2 ABA 对不定胚和茎叶再分化成植株的影响

Table 2 The effect of ABA on plantlet regeneration from somatic embryo and shoot organ

ABA 浓度 ABA concentration (mg/L)	绿芽总数 <sup>a</sup> Total shoots <sup>a</sup>	来自不定胚 <sup>b</sup> From somatic embryogenesis <sup>b</sup>	来自器官 <sup>c</sup> From <sup>c</sup> organogenesis	E/O 比 <sup>d</sup> Ratio of <sup>d</sup> E to O	再生百分率 <sup>e</sup> Percentage of regenerated plantlet <sup>e</sup>
0	50	16 ± 3.5	34 ± 3.5	32:68	12.45 ± 3.88
10	50	29 ± 2.0	21 ± 2.0	58:42	31.63 ± 5.14

注: <sup>a</sup> 调查的绿芽总数, <sup>b</sup> 来自不定胚的数量, <sup>c</sup> 来自器官分化的数量, <sup>d</sup> 来自不定胚和器官分化的比例, <sup>e</sup> 从愈伤组织块再生的植株百分数。  
Notes: <sup>a</sup> the total shoots in each treatment; <sup>b</sup> the shoots from embryogenesis; <sup>c</sup> the shoots from organogenesis; <sup>d</sup> the ratio of shoots from embryogenesis and organogenesis; <sup>e</sup> the percentages of total plantlets to callus mass transferred on regeneration medium.

实验结果显示,在未经 ABA 处理时,来源于不定胚和茎叶分化而形成植株的比率为 32:68;当用 10 mg/L ABA 预处理后,不定胚和茎叶分化成为植株的比率变为 58:42,可以说明 ABA 对于不定胚由来的再生起一定的促进作用;同时经过 ABA 处理后发育成植株的比率大大提高,接近对照的 2.5~3 倍左右。

## 3 讨论

在水稻等禾谷类作物组织培养中,ABA 对诱导胚性愈伤组织、胚状体发生以及在继代培养中保持愈伤组织胚性的作用早已得到肯定<sup>[2,7,11-14]</sup>。本研究中,在再生培养前,通过添加 ABA 进行预处理,发现 ABA 能够影响愈伤组织的结构(图 1)。我们推测,其原因可能是外源 ABA 引起愈伤组织的内源 ABA 变化,导致脱分化生理失去平衡,而引起愈伤组织向分化的转变,从而出现上述现象。通过调查绿芽的再生情况也证实了这些假设。因为前处理后,愈伤组织再生成绿芽时间明显缩短(表 1)。不同浓度的 ABA 前处理的效果也很明显,特别是 10 mg/L ABA 的效果最显著,说明愈伤组织的植株再生率与 ABA 浓度间存在剂量效应。目前通过添加两种或两种以上激素来提高愈伤组织再分化的报道很多,与本研究不同的是添加 ABA 的浓度一般为 3~5 mg/

L<sup>[7,15-17]</sup>,多种不同激素的共存可能起到相互促进与抑制的平衡作用。而我们的结果是 10 mg/L ABA 的效果更明显,与前人实验结果差异的可能原因之一是我们使用了比较均质化的长期培养愈伤组织,另一可能是在再生分化培养过程中,先在没有添加任何激素的培养基中进行了 2~3 d 前处理培养。通过绿化或有绿点出现的培养愈伤组织的石蜡切片观察(图 2)我们可以推测由不定胚发育而来的植株,其芽与根能够在同轴线上,而由茎叶分化所得植株,其根是在芽形成后由基部周围产生的,无胚性根的形成,芽和根不在同轴线上的可能性更高。因此,从再生植株的形态上,我们可以把芽与根在同轴线上的植株看成是由不定胚发育而来的,芽与根不在同一轴线上的植株看成是由茎叶分化而来的(表 2)。绿芽出现后生根的时间这一结果也部分支持了我们的推测。对于芽与根不在同轴线上的植株,根的发明显落后于芽的发育(6 d 左右),而芽与根在同轴线上的植株,根的出现仅仅比芽晚 2 d,这些结果表明 ABA 可以促进不定胚的发育而降低茎叶分化的产生。现在,仍不明确 ABA 促进愈伤组织分化的机理,有待从生理学和分子生物学等角度进一步分析培养组织的糖类构成、酶类活性、物质代谢、激素平衡与基因表达调控。

## References

- [1] Ammirato P V. The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carbi* L.). *Bot Gaz*, 1974, 135: 328-337
- [2] Chen Y-L(陈远玲), Jian Y-Y(简玉瑜), Yang Y-S(杨跃生). Comparison of culture procedures for regeneration of plants from protoplast-derived calluses of rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agron Sin*(作物学报), 2000, 26(4): 490-495(in Chinese with English abstract)
- [3] Zhang D(张栋), Chen J-C(陈季楚). Studies on the induction of embryogenic callus in rice by ABA, NAA. *Acta Biol Exp Sin*(实验生物学报), 1995, 28(3): 329-337 (in Chinese with English abstract)
- [4] Torrizo L B, Zapata F J. Anther culture in rice: IV. The effect of abscisic acid on plant regeneration. *Plant Cell Rep*, 1986, 5: 36-139
- [5] Li S-C(李双成), Wang S-Q(王世全), Yin F-Q(尹福强). Some factors affecting mature embryos callus culture in *indica* rice. *J Sichuan Agric Univ* (四川农业大学学报), 2004, 22(4): 296-300 (in Chinese with English abstract)
- [6] Gao S-J, Chen R-K, Xu L-P, Ma H-M, Zhang M-Q, Chen P-H. Establishment of plant regeneration system from mature embryo-derived callus for several *indica* rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Chin J Trop Crops*, 2004, 25(1): 73-78
- [7] Gao S-J(高三基), Chen R-K(陈如凯), Ma H-M(马宏敏). Factors influencing the regeneration frequency of mature embryo-derived callus in Hsien rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Acta Agron Sin*(作物学报), 2004, 30(12): 1254-1258(in Chinese with English abstract)
- [8] Liu C-G(刘传光), Lin Q-S(林青山), Chen Z-K(陈占宽), Jiang Y-J(江弈君), Gao Y(高云), Bai S(白嵩). Establishment of high frequently system of genetic transformation in *indica* rice. *Guangdong Agric Sci* (广东农业科学), 2002, 4(2): 2-4(in Chinese)
- [9] Li Z-L(李正理). The Production of Plant Tissue(植物组织制版学). Beijing: Peking University Press, 1996(in Chinese)
- [10] Wilen R W, Mandel R M. Effects of abscisic acid and high osmoticum on storage protein gene expression in micropore of *Brassica napus*. *Plant Physiol*, 1990, 94: 875-881
- [11] Wang Z-B(王子斌), Pan X-B(潘学彪), Tang K-X(唐克轩), Sun Z-X(孙宗修). Studies on tissue culture of *indica* rice varieties. *J Yangzhou Univ* (Nat Sci Edn)(扬州大学学报·自然科学版), 2001, 4(2): 37-41 (in Chinese with English abstract)
- [12] Abou Mandour A A, Hartung W J. The effect of abscisic acid and increased osmotic potential of the media on growth and root regeneration of *Zea mays* callus. *Plant Physiol*, 1986, 122: 139-145
- [13] David A S, Steven G S. Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. The role of amino acid additions to the regeneration medium. *Plant Sci Lett*, 1984, 34: 165-174
- [14] Spender T M. Measurement of endogenous ABA levels in chilled somatic embryos of carrot by immunoassay. *Plant Cell Rep*, 1988, 7: 352-355
- [15] Higuchi N, Maeda E. Enhanced plant regeneration in rice callus cultures following abscisic acid treatment. *Jpn J Crop Sci*, 1990, 59: 359-368
- [16] Mei C-S(梅传生), Tang R-S(汤日圣), Zhang J-Y(张金渝), Wu G-N(吴光南). Abscisic acid regulation on the rate of plantlet regeneration from rice calli *in vitro*. *J Agric Biotechnol*(农业生物技术学报), 1994, 2(1): 96-99(in Chinese with English abstract)
- [17] She J-M(余建明), Zhang B-L(张保龙), Ni W-C(倪万潮). Factors affecting plant regeneration from callus of mature embryo of "Yangdao 6". *Jiangsu J Agric Sci*(江苏农业学报), 2002, 18(4): 199-202(in Chinese with English abstract)