

新思路、新技术、新方法

Novel Thinking & Technology

## 水稻成熟胚培养高效再生系统的创新

黄赛麟 李东宣 甘树仙 朱建荣 李娟 梁晶 陈丽娟\*

云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明, 650201

\* 通讯作者, chenlijuan@hotmail.com

**摘要** 本文测试了不同消毒方式、愈伤组织诱导、绿苗分化及生根条件对不同类型水稻成熟胚培养再生成株的影响。研究表明:改良培养基比基本培养基处理效果更好,在改良培养基 N6I 愈伤诱导、MSR 绿苗分化和 MSC 生根条件下,籼稻(*O. sativa indica* cv. 滇屯 502)、粳稻(*O. sativa japonica* cv. 日本晴)、籼粳杂种 F<sub>1</sub> (滇屯 502/日本晴)和非洲栽培稻(*O. glaberrima* cv. RG105)的诱导率分别为 96%、100%、98%和 100%,成苗率分别为 264%、286%、216%和 224%。以 Yuhan Clorox (4% NaClO)稀释一半消毒 1 h 效果最好。由此建立了一套非常高效、可靠、重复性好的适用于不用基因型水稻成熟胚再生系统,为水稻遗传转化和多倍体化的顺利进行奠定了基础。

**关键词** 水稻, 成熟胚, 组织培养, 高效再生系统

## Innovation of High Effective Regeneration System for Matured Embryo *in vitro* Culture of Rice

Huang Sailin Lee Dongsun Gan Shuxian Zhu Jianrong Li Juan Liang Jing Chen Lijuan\*

College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming, 650201

\* Corresponding author, Chenlijuan@hotmail.com

**Abstract** possible factors may affect the regeneration of rice plantlets from matured embryo *in vitro* culture, such as methods of sterilizing and callus induction, differentiation and regeneration of green plantlets, and conditions for plantlet rooting, of different genotypes of *indica* and *japonica* rice, and rice cultivar from Africa were investigated. The main results showed that the treatment effect of modified medium was better than that of the basic ones, and the sterilizing of matured embryos with half of Yuhan Clorox (4% sodium hypochlorite) for one hour showed the best action. By use of modified medium, the frequency of callus induction was 96%, 100%, 98%, and 100%, frequency of rooting was 264%, 286%, 216%, and 224%, in *indica* (Diantun502), *japonica* (Nipponbare), F<sub>1</sub> of *indica/japonica*, and African (RG105) cultivars, respectively. Consequently, a high efficient regeneration system for *in vitro* culture of matured embryos of rice was established, which would be reliable and repeatable for different genotypes of rice cultivars and could further be facilitated for smooth genetic transformation and polyploidization of rice.

**Keywords** Rice, Matured embryo, Tissue culture, High efficient regeneration system

水稻在世界粮食生产和安全中有着不可忽视的地位,提高其抗性、产量及改良品质有着重要的意义(蔡得田等, 2001)。目前转化基因技术(张明洲和夏英武, 2002)和多倍体技术(蔡得田等, 2001)已较成熟,但由于受基因型的限制,水稻的遗传转化率还很低,于是对于水稻再生系统的研究也就非常的重要了,从外植体的选择到诱导成苗等一系列问题都已有广泛的研究(高三基等, 2004; 凌定厚和吉田昌一, 1987;

Gao et al., 2004)。目前用于转基因的外植体主要有胚性悬浮细胞系、成熟胚愈伤组织、幼胚及其愈伤组织、花药愈伤组织、分生组织盘、萌发的胚、叶基或根、茎尖分生组织等,其中采用成熟胚作为再生系统的外植体(Takeuchi et al., 1997; 王亚琴等, 2004; 陈璋和朱秀英, 1992)的优点在于成熟胚不受时间和季节的限制,不像幼穗取材受时空的限制,而且操作简便。影响水稻胚性愈伤组织形成和植株再生能力的

因素包括基因型、外源激素、渗透压、外植体来源、固化剂、培养基其它成份以及温度、光周期和继代时间等多个方面,其中材料的基因型和外源激素的种类、浓度和配比是最主要的因素(高三基等,2004)。不同品种的基因型差异主要表现在它们对外源激素的敏感性的不同和作用效果的差异上(凌定厚和吉田昌一,1987;陈璋和朱秀英,1992)。所以由于不同的材料以及不同的地域等因素的影响,导致很难参照一套完整的系统来得出理想的再生效果。其中对于籼稻再生系统的研究在国内外已比较广泛(高三基等,2004;凌定厚和吉田昌一,1987;殷绪明等,2007),而粳稻再生系统的研究要相对少一些,非洲栽培稻再生系统研究未见报导。在进行水稻的功能基因验证、转基因和远缘杂交结合多倍体化种质创新的研究项目中,为了构建成熟胚再生系统,我们曾经引用了很多的消毒方式和培养基配方等处理条件,但均未达到理想的效果。选择成熟胚为外植体,本研究旨在探明消毒方式和培养基成份差异对不同类型水稻(籼、粳、籼粳杂交和非洲栽培稻)成熟胚再生的影响,以期建立水稻成熟胚的高效再生系统。

## 1 材料与方 法

### 1.1 水稻材料

选择不同类型水稻品种为实验材料,其中包括料籼稻(*O. sativa indica* cv.滇屯 502,云南改良优质香软米品种)、粳稻(*O. sativa japonica* cv.日本晴,日本品种)、籼粳杂种 F<sub>1</sub>(滇屯 502/日本晴)和非洲栽培稻(*O. glaberrima* cv. RG105,引自国际水稻研究所 IRR1)。

### 1.2 培养基

用于诱导、绿苗分化和生根的培养基分为 2 组,具体配方:

(1) 基本诱导培养基 N6: N6+2,4-D 2.0 mg/L+蔗

糖(sucrose) 30g/L+琼脂(agar) 6 g/L, pH 5.8;

(2) 基本绿苗分化培养基 MS: MS+NAA 0.1 mg/L+KT 2.0 mg/L+肌醇(Myo-inositol) 0.1 g/L+蔗糖 50 g/L+琼脂 12 g/L, pH 5.7;

(3) 基本生根培养基 MS: MS+肌醇 0.1 g/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6g/L, pH 5.7;

(4) 改良诱导培养基 N6I: N6+2,4-D 2.0 mg/L+酪蛋白氨基酸 (casayino acids) 0.3 g/L+L-脯氨酸(L-proline) 2.8 g/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L, pH 5.8;

(5) 改良绿苗分化培养基 MSR: MS (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 185 mg/L +MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 3.38 mg/L +ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.72 mg/L+CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.005 mg/L, 并去掉甘氨酸)+NAA 0.1 mg/L+KT 2.0 mg/L+山梨醇 (sorbitol) 20 g/L+肌醇 0.1 g/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L, pH 5.7;

(6) 改良生根培养基 MSC: MS (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 185 mg/L +MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 3.38 mg/L +ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.72 mg/L+CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.005 mg/L, 并去掉甘氨酸)+肌醇 0.1 g/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L, pH 5.7。

### 1.3 愈伤组织诱导

消毒: 分别取上述品种水稻成熟胚为外植体,在超净工作台将种子先用 75%的酒精表面消毒 5 min, 无菌水冲洗 2 次, 分别用 1%、0.5%升汞(HgCl<sub>2</sub>)处理 20 min 和 4%、2% Yuhan Clorox (韩国产, 其中含 4% NaClO)表面消毒 1 h, 无菌水冲洗 5~10 次直至洗成白色为止。

接种: 每个直径 9 cm 的培养皿放入 20 枚成熟胚。经消毒的成熟胚接种于愈伤组织诱导培养基上(图 1a)。

### 1.4 绿苗与生根

大约诱导一个星期就能开始长出愈伤组织, 20 d 以后就能生长出大量的愈伤组织, 选取质地较硬的愈伤组织分别接种在基本绿苗分化培养基 MS 和改

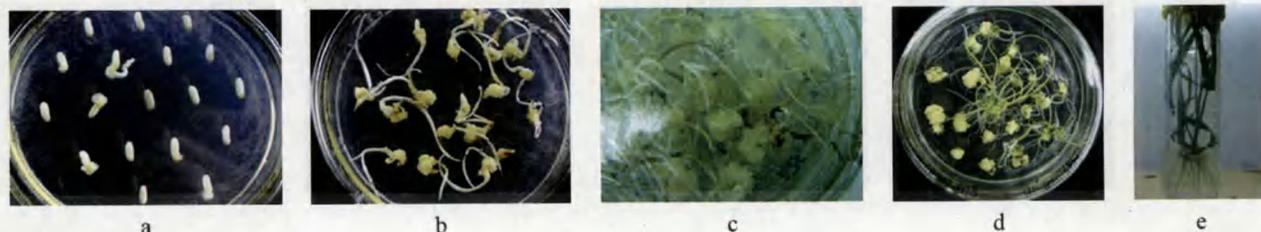


图 1 水稻成熟胚高效再生系统图

注: a: 接种; b: 愈伤组织诱导; c: 愈伤组织诱导; d: 绿苗分化; e: 生根培养

Figure 1 Picture for high efficient regeneration system from matured embryo of rice

Note: a: Inoculation; b: Callus induction; c: Callus induction; d: Callus differentiation and regeneration; e: Rooting of regenerated

良绿苗分化培养基 MSR 上进行绿苗分化培养,在全天候光照和培养温度为 26℃ 的条件下,3~4 d 以后就能在愈伤组织上出现绿点,待苗长至 3~5 cm 后剪取其全部根,然后转移至生根培养基 MSC 上,1~2 d 就能长出新根。

### 1.5 炼苗与移栽

待根长至 3~5 cm 后,就能开盖洗干净培养基炼苗了,4~5 d 待苗健壮后即刻移栽大田中。

### 1.6 计算方法

愈伤组织诱导率=愈伤组织发生数/接种外植体数×100%; 出芽率=出芽的愈伤组织数/转入分化培养基的愈伤组织数×100%; 绿苗分化率=绿苗的愈伤组织数/转入分化培养基的愈伤组织数×100%; 成苗率=绿苗数/转入分化培养基的愈伤组织数×100%; 生根率=绿苗生根数/转入生根培养基中的绿苗数×100%。

## 2 结果

### 2.1 不同消毒方式对水稻成熟胚愈伤诱导以及绿苗分化的影响

由于滇屯 502/ 日本晴粳杂交种子兼备籼、粳稻的特性,所以选用该种子作为实验材料具有很强的代表性。首先把种子脱壳,然后选取完整的成熟胚在超净台用 70%酒精浸泡 5 min,再选用不同的消毒剂进行消毒灭菌,分别比较不同消毒剂对外植体愈伤组织诱导、分化成苗的影响(表 1)。结果表明,以 Yuhan Clorox 稀释至 50%最适宜作为成熟胚消毒剂。

### 2.2 不同培养基对水稻愈伤组织诱导的影响

经添加酪蛋白氨基酸、L- 脯氨酸的改良诱导培养基 N6I 比基本诱导培养基 N6 在诱导效率上差异极其显著,甚至对于有些品种已经达到了 100%的诱导效率(表 2; 图 1b),而且所生长出的愈伤组织质地较硬、呈颗粒状和颜色淡黄(图 1c)。

表 1 不同消毒方式对水稻粳交(滇屯 502/ 日本晴) F<sub>1</sub> 成熟胚组织诱导、绿苗分化的影响

Table 1 Effects of different sterilizing methods on callus induction and differentiation from matured embryo of *indica* and *japonica* F<sub>1</sub>

处理 Treatment	接种外植体数 No. of matured embryo inoculated	愈伤外植体数(%) Frequency of callus induction (%)	绿苗分化数(%) Frequency of green plantlet differentiation (%)	成苗数(%) Frequency of plantlet regeneration (%)
0.5%升汞 0.5% mercuric chloride	60	83.33	53.33	86.66
0.1%升汞 0.1% mercuric chloride	60	75.00	86.67	105.00
Clorox (4% NaClO)	60	68.33	81.67	96.67
Clorox (2% NaClO)	60	100.00	100.00	206.67

表 2 不同培养基对水稻愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different medium on callus induction from matured embryo of rice

品种 Cultivar	培养基 Media	接种外植体数 No. of matured embryo inoculated	愈伤组织发生数 No. of callus formation	愈伤组织诱导率(%) Frequency of callus induction (%)
滇屯 502	N6	60	47	78.33
Diantun 502	N6I	60	58	96.67
日本晴	N6	60	51	85.00
Nipponbare	N6I	60	60	100.00
滇屯 502/ 日本晴	N6	60	41	68.33
Diantun502/Nipponbare	N6I	60	57	95.00
RG 105	N6	60	51	85.00
	N6I	60	60	100.00
P			<0.00**	<0.00**

注: \* 表示 P<0.05, \*\* 表示 P<0.01; 以下同

Note: \* significant different at P<0.05 probability level, \*\* significant different at P<0.01 probability level; The same as follow

### 2.3 不同培养基对水稻愈伤组织绿苗分化的影响

经改良后的绿苗分化培养基 MSR 比基本绿苗分化培养基 MS 的分化效率大大提高了(表 3), 差异显著( $P < 0.01$ )。出芽率由原来的 70%左右提高至 90%以上, 绿苗分化率也由 60%左右提高至 90%以上, 成苗率也由 80%左右提高至 210%以上了。其中对于日本晴的分化效果是最佳的(图 1d), 出芽率和绿苗分化率都达到了 100%, 成苗率也是高达 286%。

### 2.4 不同培养基对水稻再生根的影响

表 3 不同培养基对水稻愈伤组织绿苗分化的影响

Table 3 Effects of different medium on callus differentiation and regeneration from matured embryo of rice

品种 Cultivar	培养基 Media	接种愈伤组织数 No. of callus	出芽率(%) Frequency of plantlet initiation (%)	绿苗分化率(%) Frequency of green plantlet differentiation (%)	成苗率(%) Frequency of regenerated plantlet (%)
滇屯 502	MS	50	78.00	76.00	82.00
Diantun 502	MSR	50	100.00	96.67	264.00
日本晴	MS	50	82.00	80.00	85.00
Nipponbare	MSR	50	100.00	100.00	286.00
滇屯 502/ 日本晴	MS	50	70.00	62.00	86.00
Diantun502/Nipponbare	MSR	50	92.00	92.00	216.00
RG 105	MS	50	72.00	62.00	78.00
	MSR	50	96.00	96.00	224.00
P				<0.00**	<0.00**

表 4 不同培养基对水稻再生根的影响

Table 4 Effects of different medium on rooting of regenerated plantlets

品种 Cultivar	培养基 Media	分化绿苗数 No. of green shoot differentiated	生根的绿苗数 No. of green shoot rooted	生根率(%) Frequency of green root regenerated (%)	根的形态 Form of root
滇屯 502	MS	50	43	86.00	Thin and long
Diantun502	MSC	50	50	100.00	Thick and long
日本晴	MS	50	45	90.00	Thin and long
Nipponbare	MSC	50	50	100.00	Thick and long
滇屯 502/ 日本晴	MS	50	41	82.00	Thin and long
Diantun502/Nipponbare	MSC	50	49	98.00	Thin and long
RG105	MS	50	45	90.00	Thin and short
	MSC	50	50	100.00	Thick and short
P			<0.00**	<0.00**	

表 5 改良培养基对不同水稻材料再生的影响

Table 5 Effects of modified medium on the regeneration of different genotypes of rice

品种 Cultivar	愈伤组织诱导率(%) Frequency of callus induction (%)	出芽率(%) Frequency of bud initiation (%)	绿苗分化率(%) Frequency of green shoot differentiation (%)	成苗率(%) Frequency of regene- rated seedlings (%)	生根率(%) Frequency of green root regenerated (%)
滇屯 502	96.67	100.00	96.67	264.00	100.00
Diantun502					
日本晴	100.00	100.00	100.00	286.00	100.00
Nipponbare					
滇屯 502/ 日本晴	95.00	92.00	92.00	216.00	98.00
Diantun502/Nipponbare					
RG105	100.00	96.00	96.00	224.00	100.00

在生根培养基中都去掉了外源激素, 改良生根培养基 MSC 几乎达到了 100% 的生根率, 要比基本生根培养基 MS 80% 的生根率的效果提高了 20% (表 4), 二者差异显著( $P < 0.01$ ), 而且在改良生根培养基 MSC 中新根的生长速度要快的很多, 在长势上基本上都是根粗而长(图 1e)。

### 2.5 改良培养基对不同材料再生的影响

经改良后的培养基对不同的材料的再生效果是不同的(表 5), 但是其影响程度不是很大。改良后的

培养基对于日本晴的诱导、分化和生根效果是最佳的,其比率几乎都达到了100%。

## 2.6 水稻成熟胚高效再生系统的建立

根据以上实验结果建立了水稻成熟胚的高效再生系统(图2)。该系统测试了4个不同类型的材料,经次氯酸钠消毒1h后转入改良诱导培养基N6I中进行愈伤组织的诱导,再把愈伤组织转接至改良绿苗分化培养基MSR中,绿苗分化完成后就转移至改良生根培养基MSC中生根,直至炼苗移栽长成健壮的植株。我们利用该套系统对一批水稻亚种间远缘杂交后代( $F_1$ 、 $F_2$ 和 $F_3$ )进行成熟胚培养和多倍体诱导,效果理想。



图2 水稻成熟胚高效再生系统流程图

Figure 2 Protocol for high efficient regeneration system from matured embryo of rice

## 3 讨论

在比较不同消毒方式时,采用改良诱导培养基N6I,0.5%升汞处理的愈伤组织比0.1%升汞处理的其诱导率高,但成苗率大大降低,可能是因为升汞浓度高渗透入胚组织中,在后期分化过程中产生毒害使成苗率降低,这与王亚琴等(2004)测试幼胚的结果基本相同;而用Yuhan Clorox (2% NaClO)处理不仅愈伤组织诱导率高,而且成苗率也高,比王亚

琴等(2004)的研究结果在愈伤组织诱导率上高出了20%~30%。从培养基成份配比来看,与已往的研究结果对比(Gao et al., 2004; 李霞等, 2005; 殷绪明等, 2007),改良诱导培养基N6I诱导效果提高了10%~20%,差异非常明显。添加的2,4-D 2.0 mg/L对于愈伤组织的诱导能获得较高的诱导效率在以往的研究中已经得到证实(殷绪明等, 2007),也有人同时按比例添加2,4-D和KT能获得较高的诱导效率(Gao et al., 2004; 王亚琴等, 2004),而本实验仅添加了2,4-D 2.0 mg/L就能获得理想的诱导效率,这与附加的酪蛋白氨基酸、L-脯氨酸的作用也有着直接的关系。N6I对于不同基因型的水稻诱导有细微的差别,要想获得最佳的诱导效果还需针对不同的品种调整外源激素比例的来达到理想的效果。并且在绿苗分化过程中可以发现,改良绿苗分化培养基MSR在出现绿芽的时间也要比王亚琴等(2004)的结果早2~3 d,平均成苗率也高出了90%,而且生长速度也加快了很多,这与调整了培养基成份比例有着重要的关系。改良后的三种培养基对日本晴的再生效果是最好的,这一结果与以往的很多研究结果都是相近的,也与日本晴被广泛选用作为转化材料是一致的(Thilmony et al., 2006; 贾巧君等, 2006),只是效果更加好了,由此可以推测这种改良的培养基更加适用于粳稻成熟胚的再生。而对于籼粳杂交 $F_1$ 代的成熟胚诱导要稍差一些,这可能杂交后代的细胞效应有关系(陈璋和朱秀英, 1992; Gao et al., 2004)。

经改良后的诱导培养基N6I、绿苗分化培养基MSR和生根培养基MSC效率非常高,而这三种改良的培养基都是我们经历了两年时间的摸索对比而得出来的,我们曾经也引用过多种配方(傅雪琳等, 2006; 殷绪明等, 2007; 朱祯等, 2002; 王慧中等, 2000),但是都没有达到理想的效果。所以说影响水稻成熟胚再生原因还可能是由于不同的材料、不同的实验条件以及不同的地域所造成的,尤其是对于地处高海拔的云南显得突出些,因此经我们改良的培养基成份比例以及外源素的添加比例更加适合于在这一地区的水稻成熟胚的再生。本水稻成熟胚再生系统经历了大量的重复的实验验证,程序简单便于操作,效率非常高。本系统还将为水稻的转化、水稻的多倍体化等研究提供强大技术保障。

## 参考文献

- Cai D.T., Yuan L.P., and Lu X.G., 2001, A new strategy of rice breeding in the 21st century II Searching a new pathway of rice breeding by utilization of double heterosis of wide cross

- and polyploidization, *Zuowu Xuebao* (Acta Agronomica Sinica), 27(1): 110-116 (蔡得田, 袁隆平, 卢兴桂, 2001, 二十一世纪水稻育种新战略 II 远缘杂交和多倍体双重优势进行超级稻育种, 作物学报, 27(1): 110-116)
- Chen Z., and Zhu X.Y., 1992, Embryological studies on *in vitro* pollination in rice, *Zhiwu Xuebao* (Acta Botanica sinica), 34(11): 850-855 (陈璋, 朱秀英, 1992, 水稻种胚离体培养的遗传研究, 植物学报, 34(11): 850-855)
- Fu X.L., Lu Y.G., Liu X.D., and Chen Z.F., 2006, Preliminary study on the mature embryo culture characteristics of some *indica*-compatibility *japonica* lines, *Shanghai Jiaotong Daxue Xuebao* (Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)), 24(3): 230-234 (傅雪琳, 卢永根, 刘向东, 陈竹峰, 2006, 几个水稻粳型亲籼系成熟胚离体培养研究初报, 上海交通大学学报(农业科学版), 24(3): 230-234)
- Gao S.J., Chen R.K., and Ma H.M., 2004, Factors influencing the regeneration frequency of mature embryo-derived callus in Hsien rice cultivars (*Oryza sativa* L.), *Zuowu Xuebao* (Acta Agronomica Sinica), 30(12): 1254-1258 (高三基, 陈如凯, 马宏敏, 2004, 影响籼稻成熟胚愈伤组织植株再生频率的几个因素, 作物学报, 30(12): 1254-1258)
- Gao S.J., Chen R.K., Xu L.P., Li P., Ma H.M., Zhang M.Q., and Chen P.H., 2004, Establishment of plant regeneration system from mature embryo-derived callus for several *indica* rice cultivars (*Oryza sativa* L.), *Chinese Journal of Tropical Crops*, 25(1): 73-79
- Jia Q.J., Qi X.P., and Wu P., 2006, A preliminary analysis of the function of the *OsRab5a* gene in rice (*Oryza sativa* L.), *Zhiwu Shengli. Yu Fenzi Shengwuxue Xuebao* (Journal of Plant Physiology and Molecular Biology), 32(1): 37-44 (贾巧君, 齐晓朋, 吴平, 2006, 水稻 *OsRab5a* 基因功能的初步分析, 植物生理与分子生物学学报, 2(1): 37-44)
- Li X., Chen T., and Zhou Y.L., 2005, 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, 2005, 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)
- Ling D.H., and Yosida S., 1987, The study of some factors affecting somatic embryogenesis in lines of rice, *Zhiwu Xuebao* (Acta Botanica Sinica), 29(1): 1-8 (凌定厚, 吉田昌一, 1987, 影响籼稻体细胞胚胎发生几个因素的研究, 植物学报, 29(1): 1-8)
- Takeuchi Y., Sasahara T., and Sasahara T., 1997, Genetic analysis of plant regeneration from seed-derived calli in rice (*Oryza sativa* L.), *Crop Science*, 37: 963-965
- Thilmony R., Guttman M., Chiniquy D., and Blechl A., 2006, pGPro1, a novel binary vector for monocot promoter characterization, *Genetic Resources*, 24: 57-69
- Wang H.Z., Zhao P.J., Yan M.X., and Huang D.N., 2000, High frequency of plant regeneration from *indica* rice immature embryo, *Ziran Zazhi* (Chinese Journal of Nature), 22(4): 247-248 (王慧中, 赵培洁, 颜美仙, 黄大年, 2000, 籼稻组织培养高频率植株再生, 自然杂志, 22(4): 247-248)
- Wang Y.Q., Duan Z.G., Huang J.K., and Liang C.Y., 2004, Efficient regeneration from *in vitro* culture of young panicles of rice (*Oryza sativa* L.), *Zhiwuxue Tongbao* (Chinese Bulletin of Botany), 21(1): 52-60 (王亚琴, 段中岗, 黄江康, 梁承邨, 2004, 水稻幼穗培养高效再生系统的建立, 植物学通报, 21(1): 52-60)
- Yin X.M., Xu Q.G., and Li H.L., 2007, Establishment of plant regeneration system of rice callus from mature embryos of Xian-type hybrid rice parents, *Xiandai Shengwu Yixue Jinzhan* (Progress in Modern Biomedicine), 7(3): 247-250 (殷绪明, 徐庆国, 李海林, 2007, 籼型杂交稻亲本成熟胚愈伤组织再生体系的建立, 现代生物医学进展, 7(3): 247-250)
- Zhang M.Z., and Xia Y.W., 2002, Progress of rice transformation system research, *Jinhua Zhiye Jishu Xueyuan Xuebao* (Journal of Jinhua College of Profession and Technology), 1: 5-9 (张明洲, 夏英武, 2002, 水稻转化系统应用研究进展, 金华职业技术学院学报, 1: 5-9)
- Zhu Z., Zhou K.D., and Li P., 2002, Study on culture ability of calli of elite *indica* rice lines, *Sichuang Nongye Daxue Xuebao* (Journal of Sichuan Agricultural University), 20(3): 200-204 (朱祯, 周开达, 李平, 2002, 马炳田杂交籼稻亲本愈伤组织培养力的研究, 四川农业大学学报, 20(3): 200-204)