

## 水稻子葉盤癒傷組織再生系統的建立

劉程煒<sup>1)</sup> 曾夢蛟<sup>2)</sup>

關鍵字：水稻、子葉盤、癒傷組織、再生

**摘要：**本研究之目的為建立台灣栽培水稻品種之成熟胚誘導子葉盤癒傷組織的再生體系。水稻成熟種子以無菌播種於含有 2mg/L 之 2, 4-D 的 N6 基礎培養基 10 天後，置於全暗的環境下，子葉盤所誘導的癒傷組織分裂速度最快。添加 2 mg/L 之 kinetin 與 mg/L 之 NAA 的 MS 基礎培養基培養 3 週後，約 52.7 % 的 '台農 67 號' 與 98.9 % 的 '台梗 9 號' 水稻癒傷組織能夠分化出芽體。'台梗 1 號' 與 '台梗 8 號' 於完全黑暗的環境下誘導的癒傷組織，移到 ST1 培養基 4 週後，平均每顆癒傷組織能夠分化出 8.8 與 7.8 個綠芽體，在 16 小時明期與 8 小時暗期的環境中，平均綠芽體數則增加到 12 與 15.2 個。'台梗 8 號' 於 MSD 培養基中 16 小時明期與 8 小時暗期的環境下 3 週後，於再生培養基 27 天後平均有 11.2 個綠芽體，'台農 67 號' 則要全暗處理 3 週後，平均每顆癒傷組織能夠得到 8.7 個芽體。

### 前 言

水稻為世界三大糧食作物之一，近半數的世界人口以水稻為主食。水稻是台灣種植面積最廣的農作物，目前面臨加入 WTO 後在國際間的競爭，急需轉型或調整生產及增加其附加價值。目前台灣參與全球性「水稻基因組定序」及積極進行「水稻遺傳圖譜分析」與「水稻高附加價值基因轉移及基因組分析」等大型研究計畫，以水稻做為生物技術研發的模式植物，期望能開創水稻產業在台灣的第二春。雖然世界上對水稻基因轉移技術的開發，極為重視，但針對台灣經濟栽培之水稻品種的研究很少，且未能針對台灣水稻改進有利之相關基因進行開發。因此，對本省特有的水稻品種建立一套完整的基因轉移系統，是目前台灣開發水稻生物技術範疇上刻不容緩的工作。

---

1) 國立中興大學園藝學系博士班研究生。

2) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

農桿菌法基因轉移系統具有便捷、經濟、可靠與重複性高等優點，建立台灣水稻品種利用農桿菌基因轉移的模式系統，是以生物技術改良水稻的首要工作。本研究嘗試建立台灣栽培水稻品種，利用成熟胚之子葉盤所誘導的癒傷組織的再生體系。應用子葉盤誘導之癒傷組織為開始的材料，主要也是為了能銜接以它做為農桿菌法基因轉移系統的建立。本研究以目前台灣栽培面積較廣的五個水稻品種，探討不同培養基、植物荷爾蒙及培養環境條件對水稻癒傷組織分化與植株再生的關係。

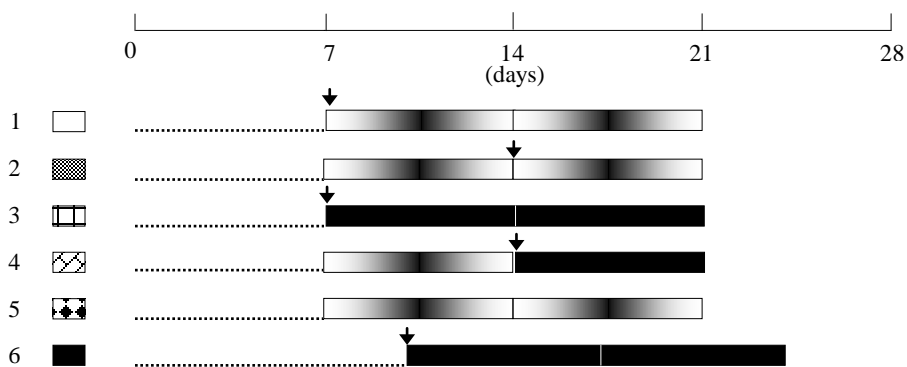
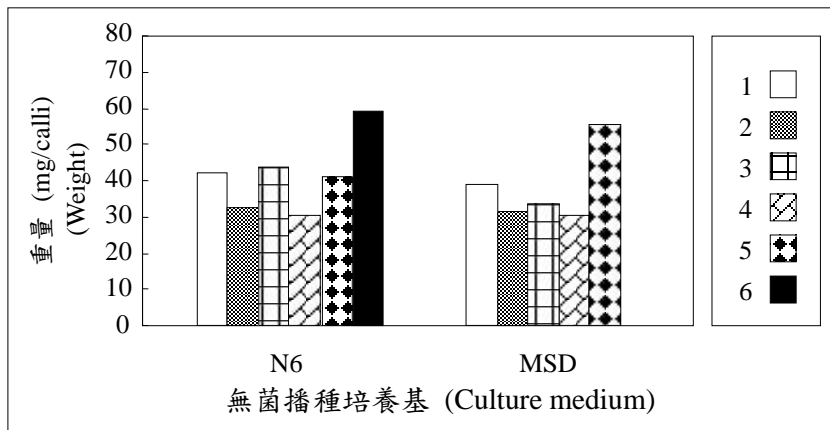
## 材料與方法

本試驗以'台農 67 號'(TN 67)、'台梗 1 號'(TK 1)、'台梗 8 號'(TK 8) 、'台梗 9 號'(TK 9) 與'台中私 10 號'(TCC 10)等 5 個水稻(*Oryza sativa* L. sub. japonica)品種為供試材料。將其種子經 70 % 酒精浸泡 3 分鐘與 2.5 % 次氯酸鈉浸泡 30 分鐘之表面滅菌後，無菌播種於含有 2 % 蔗糖、2 mg/L 之 2,4D 與 0.8% 洋菜膠(agar)的 MS 基本培養基 (MSD 培養基)或 N6 基本培養基(N6D 培養基) (Chu *et al.*, 1975)。培養條件為 25°C 黑暗中培養。取無菌播種後 5 天的子葉盤經繼代培養於 N6D 培養基，誘導癒傷組織，每 2 週繼代培養一次。

## 結 果

### 一、營養元素與光週期對水稻癒傷組織增殖的影響

將'台農 67 號'成熟種子播種於 MSD 培養基 1 週後，切除子葉盤再置於 N6D 培養基繼代培養 2 週後(光/暗，12/12hr)，癒傷組織平均鮮重為 38.74mg (圖 1，MSD，第 1 組)，而隨著繼代培養的次數減少或光週期縮短，皆會造成重量下降，但以不切離子葉盤繼代培養 3 週後的癒傷組織卻有 55.57mg (圖 1，MSD，第 5 組)，由於本組處理播種後即置於培養基中，無繼代培養亦沒有切除胚乳或胚軸，因此根系十分茂密，於 3 週後切除癒傷組織時難免無法切除完全，且癒傷組織結構較鬆散，生長點與根系無法完全切除乾淨，因此雖然平均重量較高，但實際應用於基因轉殖上並不是最合適的材料。而與直接播種於 N6D 培養基相較，除了 2 週後切下子葉盤置於 12 小時光照(N6D，第 2 組)或完全黑暗環境(N6D，第 4 組)這二組外，其餘各組平均重量較傳統的播種方式 MSD 處理約高出 3.5~30.8 %，其中以於 12 小時光週期下培養 1 週，再置於完全暗期下(N6D，第 3 組) 這組 43.92 mg/calli 最高。根據上述二組(N6D 與 MSD 無菌播種培養基)之試驗流程與培養基組成份，本實驗另將成熟種子播種於 N6D 培養基 10 天以後(明期與暗期各 12 小時)，切除子葉盤，再置於 N6D 培養基中全暗期培養 2 週(N6D，第 6 組)，發現癒傷組織平均重量高達 58.94 mg，比所有以 N6D 為無菌播種培養基的處理高出很多。此結果顯示，利用 N6D 第 6 組的方式誘



..... : 無菌播種，12hr/12hr，Light/Dark。 ↓ : 切除子葉盤的時期。

▬ : 繼代培養，12hr/12hr，Light/Dark。

■ : 繼代培養，24hr，Dark。

圖 1. 不同無菌播種培養基、繼代培養次數及光週期對'台農 67 號'水稻繼代培養 2 週後之癒傷組織的誘導及生長之影響。成熟種子播種於 N6D 或 MSD 培養基 7 或 10 天後切除子葉盤，置於 N6D 培養基，處理不同光週期及不同之繼代培養次數。

Fig. 1. The effects of germination medium, subculture, and photoperiod on the induction and growth of callus of 'TN 67' rice after 2 weeks of subculture. The scutellum was cut after seed cultured on N6D or MSD germination medium for 7 or 10 days, and cultivated in N6D medium for the induction of callus.

導癒傷組織不僅簡化了培養基的種類，亦能增加癒傷組織的增殖能力，而在'台梗 9 號'水稻品種的試驗結果中，亦得到有相似的結論(圖 2)。N6D 第 6 組(48.67 mg)與其他組別相比，最高可高達 214 % (MSD，第 1 組，22.74 mg)，次佳為 MSD 第 5 組的 44.84 mg/calli 與 N6D 第 2 組的 43.53 mg /calli。大致上以 N6D 為無菌播種培養基較以 MSD 培養的基癒傷組織增殖能力高出 20 %。

將'台農 67 號' N6D 第 1 組(圖 1)培養在繼代培養基 1 週(圖 3，第 1 組)，亦即是將成熟種子播種於 N6D 培養基 1 週後，切除子葉盤再置於 N6D 培養基繼代培養 3 週後(光/暗 12/12)，每個癒傷組織平均鮮重為 43.16 mg/calli，將其與其他組別的試驗相比較，觀察其相對生長勢的情形，以 N6D 第 6 組增加 40.5 % 達到 59.18 mg/calli(圖 3)為最高，其次為 MSD 第 2 組增加 32 % 與 N6D 第 3 組的 4.7 %。以 MSD 為發根培養基的平均生長勢皆較對照組為低，除 MSD 第 5 組外，其餘介於 73~80%，而以 N6D 為發根培養基的平均生長勢較 MSD 為佳，癒傷組織平均鮮重僅低於對照組(N6D 第 1 組)2~27 %。除 MSD 第 5 組與 N6D 第 6 組這二組生長潛力較對照組高出許多外，其餘各組大多生長不良。圖 4 為'台梗 9 號'水稻癒傷組織在不同培養基下生長 21 天後的情形，與'台農 67 號'的試驗相仿以 N6D 第 1 組的癒傷組織平均重量為 100 % 當對照組，同樣是以 N6D 第 6 組與 MSD 第 5 組這二

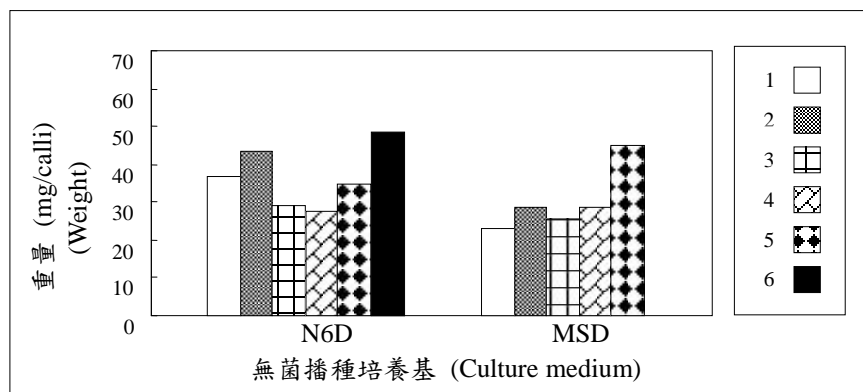


圖 2. 不同無菌播種培養基、繼代培養次數及光週期對'台梗 9 號'水稻繼代培養 2 週後之癒傷組織的誘導及生長之影響。成熟種子播種於 N6D 或 MSD 培養基 7 或 10 天後切除子葉盤，置於 N6D 培養基，處理不同光週期及不同之繼代培養次數。各符號組別之處理方式及過程與圖 1 所示相同。

Fig. 2. The effects of germination medium, subculture, and photoperiod on the induction and growth of callus of 'TK 9' rice after 2 weeks of subculture. The scutellum was cut after seed cultured on N6D or MSD germination medium for 7 or 10 days, and cultivated in N6D medium for the induction of callus. The symbols of treatments and procedures are the same as indicated in Figure 1.

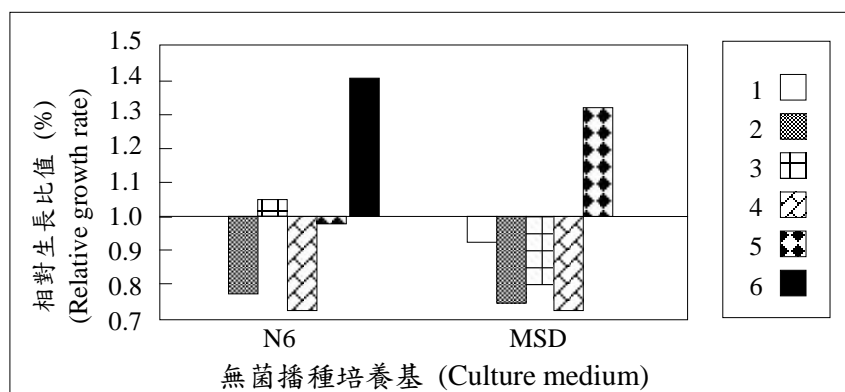


圖 3. 不同無菌播種培養基、繼代培養次數及光週期對'台農 67 號'水稻繼代培養 3 週後之癒傷組織的誘導及生長之影響。成熟種子播種於 N6D 或 MSD 培養基 7 或 10 天後切除子葉盤，置於 N6D 培養基，處理不同光週期及不同之繼代培養次數。以 N6D 第 1 組之癒傷組織重量為 100 %。各符號組別之處理方式及過程與圖 1 所示相同。

Fig. 3. Effects of germination medium, subculture, and photoperiod on the induction and growth of callus of 'TN 67' rice after 3 weeks of subculture. The scutellum was cut after seed cultured on N6D or MSD germination medium for 7 or 10 days, and cultivated in N6D medium for the induction of callus. Weight of 1<sup>st</sup> set callus of N6D was used as 100 %. The symbols of treatments and procedures are the same as indicated in Figure 1.

組效果最好，癒傷組織鮮重分別可增加 32 % 與 21%，與'台農 67 號'差異較大的是在 N6D 第 2 組這組中'台梗 9 號'癒傷組織鮮重可較對照組增加 18 %，為 51.45 mg/calli，MSD 第 1 組為最差，平均鮮重為 26.82 mg/calli，其餘的結果相類似。

## 二、生長調節物質對芽體發生的影響

分別將'台農 67 號'及'台梗 9 號'水稻經由子葉盤所誘導之癒傷組織，於 N6D 培養基全暗環境下繼代培養 3 週後(圖 1 及圖 2，N6D 第 6 組)，再移到以 MS 為基礎之培養基，並分別添加 0.1 mg/L 或 1.0 mg/L 之 NAA 與三種不同濃度之 BA、kinetin 及 zeatin 組合，觀察其癒傷組織芽體分化與荷爾蒙之關係。由表 1 之結果中可知'台農 67 號'水稻癒傷組織以 MS 為基礎培養基再添加 2.0 mg/L 之 kinetin 與 1.0 mg/L 之 NAA 的組合於 3 週後 52.7 % 的癒傷組織可以獲得再生芽梢為最好，其次為 2.0 mg/L 之 kinetin 與 0.5 mg/L 之 NAA 的 43.2 % 與 5.0 mg/L 之 kinetin 與 0.5 mg/L 之 NAA 的 30.5 %。當 zeatin 的濃度高達 5.0 mg/L 時，不論 NAA 為 0.5 mg/L 或是 1.0 mg/L 癒傷組織皆無法再生芽梢。在以'台梗 9 號'為實驗材料時發現同樣是以 2.0 mg/L kinetin + 1.0 mg/L NAA 的組合為最好，芽梢再生率高達 98.9 %，幾乎為'台農 67 號'水稻再生率的 1 倍。而癒傷組織在含有 2.0 mg/L 之 BA 與

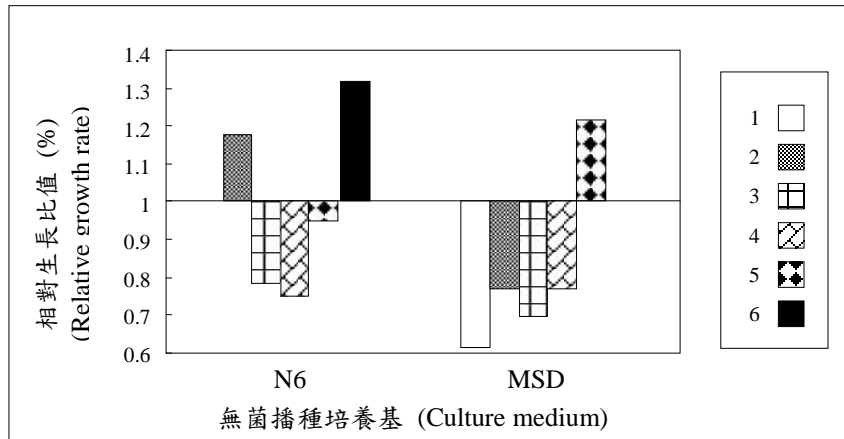


圖 4. 不同無菌播種培養基、繼代培養次數及光週期對'台梗 9 號'水稻繼代培養 3 週後之癒傷組織的誘導及生長之影響。成熟種子播種於 N6D 或 MSD 培養基 7 或 10 天後切除子葉盤，置於 N6D 培養基，處理不同光週期及不同之繼代培養次數。以 N6D 第 1 組之癒傷組織重量為 100 %。各符號組別之處理方式及過程與圖 1 所示相同。

Fig. 4. Effects of germination medium, subculture, and photoperiod on the induction and growth of callus of 'TK 9' rice after 3 weeks of subculture. The scutellum was cut after seed cultured on N6D or MSD germination medium for 7 or 10 days, and cultivated in N6D medium for the induction of callus. Weight of 1<sup>st</sup> set callus of N6D was used as 100 %. The symbols of treatments and procedures are the same as indicated in Figure 1.

1.0 mg/L 之 NAA 的 MS 培養基培養 3 週後，亦有 93.3 % 的癒傷組織可以得到再生植株，與'台農 67 號'的實驗結果相似，NAA 與 zeatin 的組合是最差的，當 zeatin 的濃度高達 5.0 mg/L 時，癒傷組織很難再生。

將表 1 中'台農 67 號'與'台梗 9 號'皆有很高再生率的組合—NAA 與 kinetin，再將 kinetin 細分為 4 個不同的濃度(1.0、2.0、3.0、5.0 mg/L)，觀察各與 4 種不同濃度的 NAA 組合對於水稻癒傷組織芽體再生之影響。如表 2 所示，與表 2-1 結果類似當培養基中 kinetin 濃度為 2.0 mg/L 時，'台農 67 號'癒傷組織最容易再生，kinetin 濃度為 5.0 mg/L 時次之，除了 NAA 濃度為 0.1mg/L 沒有再生芽點外，其餘各組再生率介於 16.7~30.5%之間，當 kinetin 濃度為 5.0 mg/L 時，再生率介於 1.2~12.2% ， kinetin 濃度為 1.0 mg/L 癒傷組織幾乎無法再生。在'台梗 9 號'水稻上之結果與'台農 67 號'相似，當 Kinetin 濃度為 2.0mg/L 時，再生率最高，介於 1.7~98.9%之間，但高低可相差近 60 倍，再生率高低依序為 2.0mg/L >3.0mg/L >1.0mg/L，但其 16 個不同組合培養基皆可獲得水稻再生植株。

表 1. MS 培養基中添加不同濃度之 cytokinin 與 NAA，對'台農 67 號'及'台梗 9 號'水稻芽體再生之影響

Table 1. The effects of different concentrations of cytokinin and NAA on shoot regeneration of rice ('TN67' and 'TK 9').

植物生長調節劑 (mg/L)			芽體再生率 <sup>**</sup> (%)	
Plant growth regulators			Shoot Regeneration percentage	
Cytokinin		NAA	'台農67號'	'台梗9號'
			'TN67'	'TK 9'
BA	2.0	0.5	6.1c	55.5b <sup>*</sup>
		1.0	13.3c	93.3a
	5.0	0.5	19.4c	20.0d
		1.0	- <sup>#</sup>	56.7b
Kinetin	2.0	0.5	43.2ab	66.7b
		1.0	52.7a	98.9a
	5.0	0.5	30.5b	27.2d
		1.0	16.7c	36.7c
Zeatin	2.0	0.5	16.1c	31.1c
		1.0	11.1c	45.0bc
	5.0	0.5	-	8.9d
		1.0	-	-

\* 每個實驗組合重複 3 次，每次選取 60 個癒傷組織。Experiments were repeated three times, 60 callus for each replication.

\* Mean separation with columns by Duncan's multiple range test, 5% level.

# 無再生。No regeneration.

### 三、不同基礎培養基對五種水稻品種綠芽體增殖的影響

分別將'台梗 1 號'、'台梗 8 號'、'台梗 9 號'、'台農 67 號'及'台中秈 10 號'等五個品種的水稻子葉盤切下，移到 3 種不同光週期之 MSD(表 3)或 N6D(表 4)培養基培養 3 週誘導癒傷組織，再繼代到 16 小時光照的生長環境下之 ST1 培養基中持續培養，觀察不同水稻品種之癒傷組織增生綠芽體之倍率與光週期的影響。由表 3 中可知'台梗 8 號'、'台梗 9 號'癒傷組織在 MSD 培養基 16 小時光照環境下，3 週後移到 ST1 培養基後第 2 週便開始再生，同時發現在此環境下之繁殖倍數較全日照或全黑暗處理所誘導之癒傷組織增生綠芽體較佳；而'台梗 1 號'則是當癒傷組織處於全日照培養第 3 週後之再生率最高，於 ST1 培養基

表 2. MS 培養基中添加不同濃度之 kinetin 與 NAA 對'台農 67 號'及'台梗 9 號'水稻芽體再生之影響。

Table 2. The effect s of different concentrations of kinetin and NAA on shoot regeneration of rice ('TN67' and 'TK 9').

植物生長調節劑 (mg/L)		芽體再生率* (%)	
Plant growth regulators		Shoot Regeneration percentage	
Kinetin	NAA	'TK 9'	'TN 67'
1.0	0.1	0.6d*	1.2d
	0.5	5.3d	-#
	1.0	2.5d	-
	1.5	12.8c	-
2.0	0.1	1.7d	-
	0.5	66.7a	43.2a
	1.0	98.9a	52.7a
	1.5	78.8a	38.6ab
3.0	0.1	1.7d	1.2d
	0.5	12.4c	12.2c
	1.0	26.7b	6.8d
	1.5	30.0b	2.9d
5.0	0.1	20.1c	-
	0.5	27.2b	30.5b
	1.0	36.7b	16.7c
	1.5	21.6bc	22.2bc

\* 每個實驗組合重複 3 次，每次選取 60 個癒傷組織。Experiments were repeated three times, 60 callus for each replication.

\* Mean separation with columns by Duncan's multiple range test, 5% level.

# 無再生。No regeneration.

繼代 6 週後平均每個癒傷組織能夠長出 16.3 個綠芽體，而以全黑暗處理所誘導之癒傷組織繁殖比率最低，繼代 6 週後平均每個癒傷組織僅能夠長出 2.7 個芽體。'台農 67 號'卻是在全黑暗環境下所誘導之癒傷組織增生綠芽體倍率最高，繼代 4 週後可達到高峰，平均每個癒傷組織能夠長出 8.7 個綠芽體，其餘 2 個處理之結果差異不大，不僅再生時間較長，增殖比例最高僅有 2.5 個芽體。



表 3. 五種不同品種之水稻在不同光週期，培養於 MSD 培養基 3 週後，再繼代到 ST1 培養基 (16/8, D/N) 中癒傷組織增生綠芽體之情形。

Table 3. The induction and formation of green bud points (GBP) cultivated in ST1 medium from callus of 5 cultivars of rice after grown under MSD medium at different photoperiods for 3 weeks.

繼代培養週數 Culture weeks	綠芽體數目 (No. of GBP/callus)					
	'台梗 1 號' 'TK 1'	'台梗 8 號' 'TK 8'	'台梗 9 號' 'TK 9'	'台農 67 號' 'TN 67'	'台中私 10 號' 'TCC 10'	
24/0 hr (D/N)	1	- <sup>#</sup>	-	-	-	-
	2	1d	-	-	-	-
	3	5.3bc	1.3cd	0.8d	-	-
	4	8.3b	3.3c	2.3c	0.7bc	-
	5	15.3a	8.7b	5.7b	2.5b	-
	6	16.3a	8.3b	5.5b	1.7b	-
0/24 hr (D/N)	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	0.1c	-
	3	0.3d	0.7d	0.3d	2.7b	-
	4	0.9d	1.1d	3.1c	8.7a	-
	5	3.0c	2.1c	3.5c	9.1a	-
	6	2.7c	2.5c	5.2b	8.8a	-
16/8 hr (D/N)	1	-	-	-	-	-
	2	-	3c	1.1d	-	-
	3	2.3c	7.6b	2.9c	-	-
	4	5.5bc	10.2a	11.2a	0.1c	-
	5	10.1b	7.9b	9.8a	0.1c	-
	6	11.9b	8.2b	5.4b	0.2c	-

\* 每個實驗組合重複 3 次，每次選取 60 個癒傷組織。Experiments were repeated three times, 60 callus for each replication.

\* Mean separation with columns by Duncan's multiple range test, 5% level.

# 無再生。No regeneration.

當子葉盤置於 N6D 培養基時，培養 3 週後所誘導癒傷組織移到 ST1 培養基再生，'台梗 1 號'、'台梗 8 號'、'台梗 9 號'在 16 小時光照環境下繼代 2 週便開始再生(表 4)，平均每個癒傷組織分別有 1.2、2.8 及 1.1 個綠芽體，於 ST1 培養基繼代 4 週後達到高峰，此時每個癒傷組織可再生高達 12、13.2 及 7.3 個綠芽體，而'台梗 8 號'在繼代培養 5 週後芽體便快速褐化，'台梗 1 號'、'台梗 8 號'之癒傷組織以全暗處理最難再生，'台梗 1 號'及'台梗 8

表 4. 五種不同品種水稻在不同光週期組合，培養於 N6D 培養基 3 週後，再繼代到 ST1 培養基 (16/8, D/N) 中癒傷組織增生綠芽體之情形。

Table 4. The induction and formation of green bud points (GBP) cultivated in ST1 medium from callus of 5 cultivars of rice after grown under N6D medium at different photoperiods for 3 weeks.

繼代培養週數 Culture weeks	綠芽體數目 (No. of GBP/callus)					
	'台梗 1 號' 'TK 1'	'台梗 8 號' 'TK 8'	'台梗 9 號' 'TK 9'	'台農 67 號' 'TN 67'	'台中私 10 號' 'TCC 10'	
24/0 hr (D/N)	1	- <sup>#</sup>	-	-	-	-
	2	0.9d	0.2d	-	-	-
	3	4.5c	2.5c	-	-	-
	4	8.8bc	7.8b	1.1c	0.2c	-
	5	11.3b	11.2ab	1.9c	0.9bc	-
	6	15.5a	12.1a	3.7d	1.5b	-
0/24 hr (D/N)	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	0.5d	-	0.4c	-
	4	1.2d	0.9d	0.8c	2ab	-
	5	2.2d	1.7cd	2.3b	2.8a	-
	6	2.5d	2.4c	3.1b	2.8a	-
16/8 hr (D/N)	1	-	-	-	-	-
	2	1.2d	2.8c	1.1c	-	-
	3	2.3d	8.8b	1.8c	-	-
	4	12.0b	13.2a	7.3a	-	-
	5	15.0a	5.5c	7.4a	0.1c	-
	6	13.6b	3.7c	7.4a	0.1c	-

\* 每個實驗組合重複 3 次，每次選取 60 個癒傷組織。Experiments were repeated three times, 60 callus for each replication.

\* Mean separation with columns by Duncan's multiple range test, 5% level.

# 無再生。No regeneration.

號'在全日照處理之環境下雖然亦很快可以獲得再生水稻，但其平均增殖數目與效率還是較 16 小時光照處理差；'台梗 9 號'則是不論全日照或是全暗處理再生率皆不理想；'台農 67 號'水稻之癒傷組織仍是以全暗培養下的再生率最高，介於 0.4~2.8 個之間，以 16 小時光照所誘導之癒傷組織再生率最差，很難獲得'台農 67 號'再生水稻；與表 3 相同'台中私 10 號'不論任何處理癒傷組織皆無法獲得再生芽體。

#### 四、水稻再生系統的建立

'台農 67 號'及'台梗 9 號'水稻癒傷組織經 MSD 或 N6D 繼代培養 3 週後，置於 ST1 培養基再生的結果如圖 5 所示，'台梗 9 號'不論在何種培養基約 4 週後，癒傷組織 100%再生出芽梢。'台農 67 號'水稻置於 N6D 培養基中於第 5 週後皆可再生，而初期 1 週置於 MSD 培養基中所誘導的癒傷組織，於 5 週後僅有 71.43%的癒傷組織再生出芽梢，此後便不再增加，而 TN67-N6D-L(即 N6D 第 6 組)這組雖於培養 4 週後達到 88%再生率後，便不再增加，但由於其平均每個癒傷組織的再生數目甚高，對於基因轉殖的利用較有優勢，因而選用此組做為基因轉殖再生的系統。

將無菌播種於 N6D 培養基 10 天後的'台農 67 號'水稻子葉盤切下，於全暗環境下繼代培養 3~4 週後，當誘導之癒傷組織直徑約 2~4 mm 時便可進行再生或是農桿菌基因轉移。

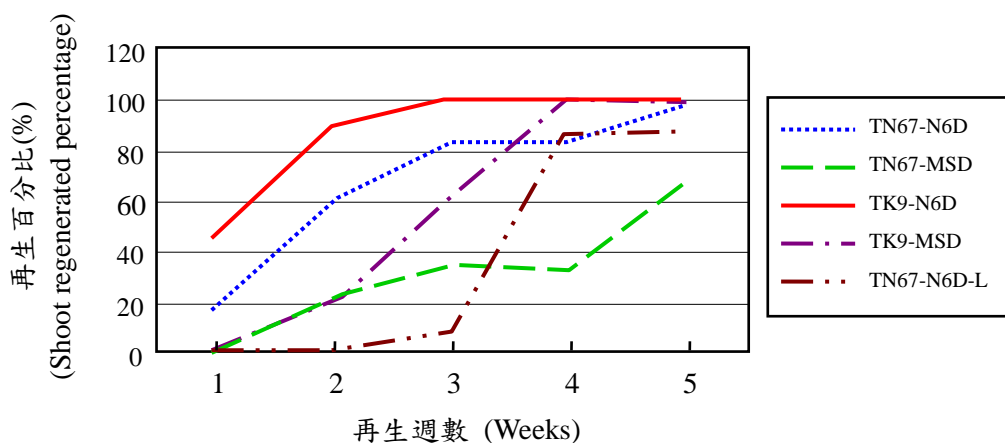


圖 5. '台農 67 號'與'台梗 9 號'水稻癒傷組織經不同處理誘導芽梢再生的情形。

Fig. 5. The shoot regenerated percentage of 'TN 67' and 'TK 9' rice in different cultured medium.

## 討 論

穩定並有效率的再生方式是建立基因轉移系統的首要條件。水稻未成熟胚或子葉盤所誘導的癒傷組織皆可用為農桿菌法感染的材料(Mezencev *et al.*, 1995)。本研究結果顯示不論'台農 67 號'或'台梗 9 號'以 N6D 第 6 組處理(圖 1、圖 2)，不但癒傷組織平均重量最高，並而簡化了培養基種類，使得繼代培養更加容易。以不切離子葉盤繼代培養 3 週後之處理組(MSD 第 5 組，N6D 第 5 組)，平均癒傷組織亦很重，但由於其播種後即置於培養基中，無繼代培養亦沒有切除胚乳或胚軸，因此根系十分茂密，於 3 週後切除癒傷組織時難免無法切除完全，且癒傷組織結構較鬆散，生長點與根系無法完全切除乾淨，誘導體胚時生長點容易再生，因此雖然平均重量較高，但實際應用於基因轉殖上並不是最合適的材料。隨著繼代的次數增加各組間的差異更加明顯，於切除子葉盤 7~10 天後再繼代培養 21 天，'台農 67 號' N6D 第 6 組的處理與 MSD、N6D 其它多組平均癒傷組織重相差約 30% 左右，其餘處理組則更差(圖 3)。「台梗 9 號」N6D 第 6 組之處理 MSD、N6D 其它多組相差不大，約 10% 左右(圖 4)，與'台農 67 號'的結果類似，其餘處理組結果皆不佳。子葉盤所誘導的癒傷組織是很好的基因轉移材料(Hiei *et al.*, 1994)，Chu 等人(1975)指出將未成熟或成熟種子播種於 MS 基礎培養基後並置於黑暗下培養，再移到 N6 基礎培養基下繼代培養對於癒傷組織的增殖有明顯的幫助，Jain 等人(1996)也有類似的結論。Rashid 等人(1996)指出不同品種的水稻，癒傷組織增殖的較果差異很大，本研究修飾 Rashid 等人(1996)的培養基配方，試驗結果較 Rashid 等人的報導結果更好。

氧氣濃度(Okamoto *et al.*, 1996)、培養基硬度(Jain *et al.*, 1996; Rashid *et al.*, 1996)、培養基糖類濃度(Xue and Earle, 1995)、植物荷爾蒙與品種間的差異(Tsukahara *et al.*, 1996)皆會影響到癒傷組織的增殖與芽梢的再生。許多文獻指出水稻癒傷組織再生時所使用的植物荷爾蒙皆有 auxin 類的 NAA，所使用的濃度相差很大，有 0.5 mg/L(Jain *et al.*, 1996; Xue and Earle, 1995)、1mg/L(Rashid *et al.*, 1996)、2 mg/L(Tsukahara *et al.*, 1996)等，並搭配不同種類與濃度的細胞分裂素，計有 BA、kinetin 以及 zeatin 等各式配方培養基。由於沒有詳細資料可供參考，且對於本省所栽種的品種並不一定合適，因此選取不同濃度的 NAA 配合 BA、kinetin 及 zeatin 等三種植物荷爾蒙，觀察不同荷爾蒙比例對'台農 67 號'與'台梗 9 號'綠芽體再生的影響。試驗結果顯示'台農 67 號'及'台梗 9 號'等二個品種的水稻癒傷組織皆以 MS 為基礎並添加 2.0 mg/L kinetin + 1.0mg/L NAA 的組合配方可以獲得最多的芽體再生(表 1)，且 kinetin 的各種組合皆較其他二種荷爾蒙好，與 Rashid 等人(1996)及 Tsukahara 等人(1996)的實驗結果相符。再將四種濃度的 kinetin (1, 2, 3, 4 mg/L)與 NAA(0.1, 0.5, 1, 1.5 mg/L)相互搭配找出最合適的培養基，結果顯示以 2.0 mg/L kinetin 的濃度最好，高濃度的 NAA 較低濃度的有較高的再生率，而當 kinetin 濃度減為 1.0 mg/L 時，不論 NAA 為何幾乎無法再生(表 2)。

Morita 等學者(1999)將於黑暗下誘導之水稻癒傷組織，移到含有 4 mg/L 之 2, 4-D 的

PM 培養基中 9 天，芽體的增殖率較沒有處理與長時間處理的高，移到再生培養基 20 天後 85 % 以上的癒傷組織都有新芽增生，此外培養室的溫度與光線的強弱亦會影響到芽體的再生(Peng *et al.*, 1992)。本研究分別將'台梗 1 號'、'台梗 8 號'、'台梗 9 號'及'台農 67 號'四個品種的水稻子葉盤切下，移到三種不同光週期之 MSD 或 N6D 培養基中培養，並觀察平均每個癒傷組織綠芽體增殖的倍率(表 3, 4)。試驗結果顯示不論何種培養基，'台梗 1 號'與'台梗 8 號'皆較其他品種高，'台梗 1 號'以全暗期處理組再生率最低，而培養於 N6D 中較快獲得再生植株，'台梗 8 號'與之類似。台梗 9 號癒傷組織培養於 16hr/8hr(明/暗)環境下，最容易再生，但在 N6D 培養基 4 週後有停止分化的情形，而同樣'台梗 8 號'於 N6D 培養基繼代 5 週後芽體便快速褐化。

'台農 67 號'及'台梗 9 號'水稻癒傷組織經 MSD 或 N6D 繼代培養 3 週後，置於 ST1 培養基再生，約 4 週後'台梗 9 號'癒傷組織 100 % 再生出芽梢(圖 5)。「台農 67 號」水稻置於 N6D 培養基中於 5 週後完全再生，而播種期間置於 MSD 培養基中所誘導的癒傷組織，於 5 週後僅有 71.43 % 的癒傷組織再生出芽梢，此後便不再增加。綜合以上結果，'台農 67 號'及'台梗 9 號'水稻癒傷組織播種於 N6D 培養基 10 天後，於全暗期誘導癒傷組織 3 週後於含有 2 mg/L kinetin 及 1 mg/L NAA 培養基中再生為最方便與最有效率的再生系統，對於農桿菌基因轉移技術的改良與發展有很大的幫助。

以'台梗 9 號'水稻為例，將成熟種子播種於添加 2mg/L 之 2, 4D 的 N6 基礎培養基(N6D)1 週後，切下子葉盤移到光週期為 12 小時的 N6D 培養基中誘導癒傷組織分裂，每週繼代培養 1 次，約 3 週後平均每個癒傷組織重約 60 mg/calli。所誘導的癒傷組織於添加 2 mg/L 之 kinetin 及 1 mg/L 之 NAA 的 MS 修飾培養基中(ST1)培養 3 週後，99 % 的'台梗 9 號'癒傷組織皆能再生出芽梢，而於 16 小時的光照環境下培養 4 週後，平均每個癒傷組織能夠分化出 7.3 個綠色芽體，此為最佳的'台梗 9 號'水稻癒傷組織誘導再生步驟。

### 參考文獻

- Chu, C. C., C. C. Wang, C. S. Sun, C. Hsu, K. C. Yin, C. Y. Chu, and F. Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 18: 659-668.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari, and T. Kumashiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6(2): 271-282.
- Jain, R. K., S. Jain, B. Wang, and R. Wu. 1996. Optimization of biolistic method for transient gene expression and production of agronomically useful transgenic Basmati rice plants. *Plant Cell Rep.* 15: 963-968.
- Mezencev, N., G. Clément, and G. Guiderdoni. 1995. Variation among progenies of diploid plants regenerated from haploid, microspore-derived cell suspension protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breed.* 114: 149-154.
- Morita, M. X. H. Xing, and H. Unno. 1999. Synchronized shoot regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) calli on solid medium by adjusting intracellular 2,4-D concentration. *Plant Cell Rep.* 18: 633-639.
- Okamoto, A., S. Kishine, T. Hirosawa, and A. Nakazono. 1996. Effect of oxygen-enriched aeration on regeneration of rice cell culture. *Plant Cell Rep.* 15: 731-736.
- Peng, J., H. Kononowicz, and T. K. Hodges. 1992. Transgenic *indica* rice plants. *Theor. Applied Genet.* 83: 855-863.
- Rashid, H., S. Yokoi, K. Toriyama, and K. Hinata. 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *Indica* rice. *Plant Cell Rep.* 15: 727-730.
- Tsukahara, M. T. Hirosawa, and H. Murayama. 1996. Effect of culture methods on the regeneration of albino rice (*Oryza sativa* L.) plantlets. *Plant Cell Rep.* 15: 597-600.
- Xue, Q. and E. D. Earle. 1995. Plant regeneration from protoplasts of cytoplasmic male sterile lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep.* 15: 76-81.

## Plant Regeneration from Scutella-Derived Embryogenic Calli of Rice (*Oryza sativa* L.)

Cheng-Wei Liu <sup>1)</sup>    Menq-Jiau Tseng <sup>2)</sup>

Key words: Rice, Scutellum, Callus, Regeneration

### Summary

The purpose of this study is to develop a simple and highly efficient protocol for plant regeneration from scutella-derived embryogenic calli of rice (*Oryza sativa* L.). Vigorous growth of scutella-derived embryogenic calli was obtained from the mature rice seeds germinated in the N6 medium containing 2.0 mg/L of kinetin and 1.0 mg/L of naphthaleneacetic acid for 10 days, and followed by cultivation in the dark for 10 days. Fifty-three and ninety-nine percentages of regeneration rate of green buds from embryogenic calli was achieved in the 'TN67' and 'TK9' rice, respectively, after three weeks of cultivation in the MS medium containing 2.0 mg/L of kinetin and 1.0 mg/L of naphthaleneacetic acid. The average number of green buds emerged from each callus (GBP/callus) was 8.8 and 7.8 in 'TK1' and 'TK8' rice, respectively, after four weeks of cultivation in the ST1 medium, while 12 and 15.2 GBP/callus, respectively, after supply with a 16-hr photoperiod. The GBP/callus was 11.2 in 'TK8' rice after four weeks of cultivation in the MSD medium supply with 16-hr photoperiod, but only 8.7 GBP/callus in 'TN67' rice after three weeks of cultivation in the dark.

---

1) Graduate student in Ph.D. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

