

水稻愈伤组织增殖力的遗传研究

张林¹, 服部一三²

(1 华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642; 2 日本名古屋大学 农学部, 日本国名古屋市 464-01)

摘要: 考察了高愈伤组织增殖力的粳稻品种 Aikoku 和低愈伤组织增殖力品种 Moritawase、Norin 1 杂交组合的双亲和正反交 F_1 、 F_2 、 F_3 的愈伤组织增殖力。正反交 F_1 呈现大而淡黄、与 Aikoku 相似的高愈伤组织增殖力类型, 而 Moritawase 和 Norin 1 呈现小而褐色的低愈伤组织增殖力类型。 F_2 中, 高、低愈伤组织增殖力类型的个体符合 13:3 的比例。 F_3 世代, 高愈伤组织增殖力株系、愈伤组织增殖力分离的株系及低愈伤组织增殖力的株系符合 7:8:1 的比例。3 个世代的结果一致表明, Aikoku 所具有的高愈伤组织增殖力由相互独立的 1 对显性和 1 对隐性基因支配, 不受细胞质的影响。研究结果还表明愈伤组织增殖力和再生力由不同的基因控制。本研究使用的愈伤组织诱导培养基是 1/2 MS+3 mg/L 2, 4-D+5 g/L 酵母粉+30 g/L 蔗糖+11 g/L 琼脂。

关键词: 水稻; 愈伤组织增殖力; 遗传

中图分类号: Q37

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2003)04-0044-04

一个高效率的愈伤组织形成和再生的组织培养体系是转基因、细胞融合、体细胞变异和筛选等生物技术育种上应用的基础。大量的研究和转基因的育种实践表明, 不同水稻品种间在组织培养特性上有很大不同, 且粳稻较籼稻为好^[1,2]。许多农艺性状优良的品种, 尤其是籼稻品种带有不良的组织培养特性, 即使在最好的培养条件下愈伤组织增殖或再生的效率也很低, 以致对这些品种用生物技术进行改良相当困难。在玉米、西红柿中, 用育种的方法转移控制良好组培特性的基因到农艺性状优良的遗传背景中, 克服了类似的障碍^[3,4]。因此, 近年来组织培养特性的遗传研究随着生物技术在育种中应用的深入而愈来愈受重视。

有关水稻组培特性的遗传研究在再生力方面有较多的报道, 不少双列杂交的研究表明, 水稻体细胞培养愈伤组织的再生力表现较高的遗传力^[5~9]。作者在 1996 年报道了一个控制高再生力的显性基因^[10], 1998 年又找到了另一个控制高再生力的隐性基因^[11], Takeuchi 等^[12]于 1997 年也报道了一个控制高再生力的显性基因。对愈伤组织增殖力的研究却少见报道。Abe 和 Futsuhara^[6]报道了水稻愈伤组织增殖力与 2 组基因有关, 并且在高增殖力的 Kuju 与低增殖力的 Somewake 的 F_2 中, 低增殖力和高增殖力类型的分离符合 1 对因子分离的 3:1 的理论比。有关研究还表明^[1], 水稻的愈伤组织增殖和再生力是由不同的基因控制的。以水稻的成熟种胚为外植体诱导愈伤组织具有不受季节限制、取材方便等优点,

故被广泛应用于转基因等生物技术的研究中, 本实验分析了成熟胚诱导的愈伤组织增殖力的遗传模式, 为生物技术育种中克服遗传性低愈伤组织增殖力的障碍提供依据。

1 材料与与方法

试验于 1996 年在日本名古屋大学农学部植物遗传育种研究室开始实施, 1998~2000 年在华南农业大学农学院继续进行并完成。

1.1 材料

遗传研究的亲本为在预备试验中表现良好愈伤组织增殖力的粳稻品种 Aikoku 和愈伤组织增殖力不良的粳稻品种 Moritawase 及 Norin 1。将 Aikoku 和低愈伤组织增殖力的亲本杂交、自交后得到 F_1 、 F_2 、 F_3 的种子供组织培养用。

1.2 组织培养

脱颖后的成熟种子用 φ 为 75% 的乙醇浸泡 30 s, 再用 φ 为 1% 的次氯酸钠溶液浸泡 45 min 消毒, 用无菌水洗 3 次后, 接种在愈伤组织诱导培养基上, 置于 28 °C、连续光照条件下培养。愈伤组织诱导培养基为 1/2 MS+3 mg/L 2, 4-D+5 g/L 酵母粉+30 g/L 蔗糖+11 g/L 琼脂。愈伤组织的再生培养基采用 1/2 MS+1/2 N₆+0.5 mg/L NAA+8 mg/L Kinetin+30 g/L 蔗糖+3 g/L gelrite。以上培养基 pH 均调至 5.8, 121 °C、20 min 高压灭菌。

1.3 愈伤组织增殖力的遗传分析

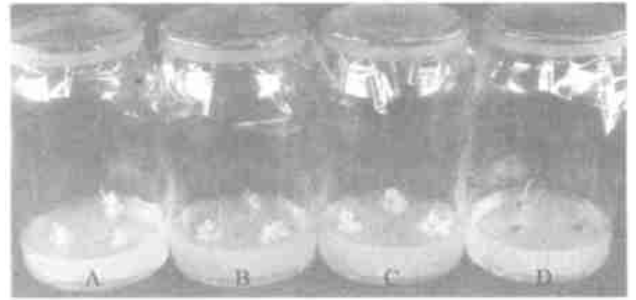
接种后第 3 周, 调查高×低愈伤组织增殖力杂

交组合的亲本、正反交 F_1 、 F_2 及 F_3 株系的愈伤组织增殖力。用 χ^2 测验检测杂种群体的分离与理论比的适合性,进而分析该性状的遗传模式。在愈伤组织诱导培养基中培养 4 周后,由 1 个种子诱导出的愈伤组织被分成大小大约一致的小块并转移到再生培养基中培养 4 周后,按个体调查愈伤组织的再生率,以考察愈伤组织增殖力和再生力的遗传关系。

2 结果与分析

在本试验的培养条件下,高愈伤组织增殖力的品种 Aikoku 呈现淡黄色的大愈伤组织,而低愈伤组织增殖力品种 Moritawase 和 Norin 1 呈现褐色的小愈伤组织,Aikoku 和 Moritawase、Norin 1 表现出截然不同的愈伤组织类型,且这 2 种类型根据颜色和大小在外观上易于鉴别(图 1)。

Aikoku 与 Moritawase、Norin 1 杂交 F_1 的愈伤组织与 Aikoku 相似,表现大而淡黄的高增殖力类型(图 1),正反交一致,说明高愈伤组织增殖力在 F_1 表现显



A. Aikoku B. Aikoku×Norin 1 F_1 ,
C. Norin 1×Aikoku F_1 D. Norin 1

图 1 培养 3 周后亲本和杂种愈伤组织类型

Fig. 1 Callus type of parent and hybrids after 3 weeks of culture

性,且细胞质对该性状没有影响。因此,选用 Aikoku×Norin 1 和 Aikoku×Moritawase 2 个组合的 F_2 做进一步的分析。这 2 个杂交组合 F_2 的个体出现大而淡黄的高增殖力类型和小而褐色的低增殖力类型的分离,在以上 2 个组合中这 2 种类型的个体比例分别为 117:24 和 123:30, χ^2 测验的结果都符合 1 对显性和 1 对隐性基因独立分离的 13:3 比例(表 1)。对

表 1 亲本、 F_1 和 F_2 的愈伤组织类型

Tab. 1 Callus type of parents F_1 and F_2

亲本和杂种 parents and hybrids	供试种子数 seeds tested /粒	愈伤组织类型 type of callus		χ^2	P
		大、淡黄色 large and yellow	小、褐色 small and brown		
Aikoku	18	18			
Moritawase	16		16		
Aikoku×Moritawase F_1	8	8			
Moritawase×Aikoku F_1	4	4			
Aikoku×Moritawase F_2	141	117	24	0.106 (13:3)	0.50~0.75
Aikoku	37	37			
Norin 1	36		36		
Aikoku×Norin 1 F_1	21	21			
Norin 1×Aikoku F_1	14	14			
Aikoku×Norin 1 F_2	153	123	30	0.011 (13:3)	> 0.90

Aikoku×Moritawase F_3 株系愈伤组织增殖力的考察结果,163 个株系中有 65 个高增殖力的株系、90 个高和低增殖力个体分离的株系及 8 个低增殖力的株系,与 1 对显性和 1 对隐性基因独立遗传的 7:8:1 理论比进行卡平方测验, χ^2 值为 1.688 ($\chi^2_{0.05} = 5.911$), 差异不显著。对 F_1 、 F_2 和 F_3 的分析结果一致表明,Aikoku 所具有的高愈伤组织增殖力由相互独立的 1 对显性和 1 对隐性基因控制。

将 122 个 F_2 个体诱导出的愈伤组织转移到再生培养基中,4 周后调查,这些个体的再生率在 0~87.5% 之间,并且愈伤组织增殖不良和良好的个体都有再生率高和低的类型,证明这 2 个性状由不同

的基因控制。

3 讨论

Abe 和 Futsuhara^[6] 对水稻成熟胚培养的愈伤组织增殖力进行了双列杂交分析,结果是愈伤组织增殖力与 2 组基因有关,广义和狭义遗传力分别为 0.978 和 0.933,而且在 Kuju×Somewake 的 F_2 中,他们观察到了低、高愈伤组织增殖力个体呈 3:1 的分离。而在本研究中,高愈伤组织增殖力表现由 1 对显性和 1 对隐性基因控制。从 Abe 和 Futsuhara 以及本研究的结果看,水稻的愈伤组织增殖力至少与 2 个以上的基因位点有关。

Koornneef等^[13]曾报道,西红柿组织培养中的愈伤组织形成和植株再生是遗传上没有相关关系的2个性状。Abe和Futsuhara^[1]也指出,水稻成熟胚培养的愈伤组织生长和再生由不同的基因控制。本试验在F₂群体中观察到愈伤组织增殖不良和好的个体都有再生率高和低的类型,也证实了这2个性状由不同的基因控制。在小麦和*Solanum phureja*中,花药与体细胞培养的性状是由不同基因控制的^[14~15],据张林等^[16]的研究结果,水稻花药培养的愈伤组织诱导率和成熟胚培养的愈伤组织增殖率也很可能由不同的遗传因子支配。种种现象表明,植物的组织培养特性是复合的性状,我们认为有必要分别针对组织培养特性的各个组分进行研究。

目前,用育种的手段转移高愈伤组织增殖力和再生力基因是克服遗传性组织培养特性不良障碍的唯一途径。粳稻品种Aikoku带有2个控制高愈伤组织增殖力和1个控制高再生力的主效基因^[10],是育种中改良低愈伤组织增殖力和再生力的良好基因供体。

尽管已对植物组织培养的愈伤组织形成和再生进行了大量的研究,但植物细胞全能性的机理仍然没有得到阐明^[17]。正是由于这个缘故,对培养条件的探讨有时很盲目。近年来,玉米^[4, 18],大麦^[19, 20]、苜蓿^[21]和西红柿^[22]中控制花药或体细胞培养愈伤组织形成和再生的基因已被定位到染色体上,何平等^[23]也定位了与水稻花药培养愈伤组织诱导和再生率有关的QTL位点。这些进展预示着克隆和进一步研究这些基因的可能性。对这些基因结构、功能的深入研究,可望为植物脱分化、再分化机理的探讨提供线索,而脱分化和再分化机理的解明,必将为解决生物技术育种中遗传性的愈伤组织形成和再生不良的障碍提供新途径。

参考文献:

- [1] ABE T, FUTSUHARA Y. Genotypic variability for callus formation and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L) [J]. Theor Appl Genet, 1986, 72: 3—10.
- [2] SHANKHDHAR D, SHANKHDHAR S C, PANT R C. Genotype variation of induction and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L) [J]. Indian Journal of Plant Physiology, 2001, 6 (3): 261—264.
- [3] KOONNEEF M, JONGSMA C M, TOMA I, et al. Breeding of a tomato genotype readily accessible to genetic manipulation [J]. Plant Science, 1986, 45: 201—208.
- [4] ARMSTRONG C L, ROMERO-SEVERSON, HODGES T K. Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis [J]. Theor Appl Genet, 1992, 84: 755—762.
- [5] PENG J, HODGES T K. Genetic analysis of plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L) [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1989, 25: 91—94.
- [6] ABE T, FUTSUHARA Y. Diallel analysis of callus growth and plant regeneration in rice seed-callus [J]. Jpn J Genet, 1991, 66: 129—140.
- [7] 陈璋, 朱秀英. 水稻种胚培养若干性状的遗传分析 [J]. 遗传, 1993, 15(4): 23—27.
- [8] TSUKAHARA M, HIROSAWA T, NAGAI E, et al. Genetic analysis of plant regeneration ability and cell suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L) [J]. Breeding Science, 1995, 45: 425—428.
- [9] TAGUCHI-SHIOBARA F, KOMATSUDA T, OKA S. Comparison of two indices for evaluating regeneration ability in rice (*Oryza sativa* L) through a diallel analysis [J]. Theor Appl Genet, 1997, 94: 378—382.
- [10] ZHANG L, HATTORI K. Genetic analysis of regeneration ability in rice seed-callus [J]. Genes Genet Syst, 1996, 71: 313—317.
- [11] ZHANG L, HATTORI K. Inheritance of shoot regeneration ability of seed callus in a rice cultivar Joshu [J]. Breeding Science, 1998, 48: 41—44.
- [12] TAKEUCHI Y, ABE T, SASAHARA T. Genetic analysis of plant regeneration from seed-callus in rice (*Oryza sativa* L) [J]. Crop Science, 1997, 37: 963—965.
- [13] KOONNEEF M, HANHART C, MARIANELLI L. A genetic analysis of cell culture traits in tomato [J]. Theor Appl Genet, 1987, 74: 633—641.
- [14] AGACHE S, DE BUYSER HENRY Y, et al. Studies of the genetic relationship between anther culture abilities in Wheat [J]. Plant Breeding, 1988, 100: 26—33.
- [15] THOMAS E T, RICHARD E V. Inheritance of competencies for leaf disc regeneration, anther culture, and protoplast culture in *Solanum phureja* and correlation among them [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1992, 31: 95—103.
- [16] ZHANG L, FU X L, CHEN X H. Studies of genetic relationship between the traits of anther culture and somatic tissue culture [J]. Abstracts of International Rice Genetics Symposium, 2000, 4: 351.
- [17] CHU C C. Contributions of Chinese Botanists to Plant Tissue Culture in the 20th Century [J]. Acta Bot Sin, 2002, 44: 1 075—1 084.
- [18] COWEN N, JOHNSON C D, ARMSTRONG K, et al. Mapping genes conditioning *in vitro* androgenesis in maize using RFLP analysis [J]. Theor Appl Genet, 1992, 84: 720—724.
- [19] KOMATSUDA T, ANNAKA T, OKA S. Genetic mapping of a quantitative trait locus (QTL) that enhances the shoot dif-

- ferentiation rate in *Hordeum vulgare* L [J] . Theor Appl Genet, 1993, 86: 713—720.
- [20] MANO Y, TAKAHASHI H, SATO K, et al. Takeda Mapping genes for callus growth and shoot regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L) [J] . Breeding Sciences, 1996, 46: 137—142.
- [21] YU K, PAULA K P. Identification of a RFLP marker associated with somatic embryogenesis in alfalfa [J] . Plant Molecular Biology, 1993, 22: 269—227.
- [22] KOORNNEEF M, BADE J, HORSMAN K, et al. Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato [J] . The Plant Journal, 1993, 3: 131—141.
- [23] 何平, 沈利爽, 陆朝福, 等. 水稻花药培养力的遗传分析及基因定位 [J] . 遗传学报, 1998, 25: 337—344.

Genetic Study on Callus Growth Ability in *Oryza sativa* L.

ZHANG Lin¹, HATTORI Kazumi²

(1 College of Agronomy, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 School of Agricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya 464-01, Japan)

Abstract: Callus growth ability of F₁, F₂ and F₃ from reciprocal cross combinations of high callus growth ability *japonica* cultivar Aikoku with low callus growth ability *japonica* cultivar Moritawase and Norin 1 was observed. The reciprocal F₁s showed high growth ability type callus similar to Aikoku. In the F₂ population, the individuals of high and low callus growth ability fitted 13 : 3 ratio. In the F₃ population, non-segregated high callus growth ability line : segregated line : non-segregated low callus ability line fitted 7 : 8 : 1 ratio. The results derived from the three generations demonstrated that the high callus growth ability in Aikoku was controlled by one dominant and one recessive gene independently and there was no cytoplasmic effect on this trait. The results also indicated that the callus growth and regeneration were controlled by different gene. Half concentration MS basal medium containing 3 mg/L 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D), 5 g/L yeast extract, 30 g/L sucrose and 11 g/L agar was used for callus induction.

Key words: rice; callus growth ability; inheritance

【责任编辑 周志红】