

雄性不育基因对棉花的遗传转化

张慧军¹, 王寰宇², 石跃进¹, 张玉满², 岳建雄¹, 吴慎杰¹, 朱永红¹, 刘玉乐², 杨怀义^{2*}
(1. 山西农业科学院棉花研究所, 山西 运城 044000; 2. 中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要:利用 TA29、A6、A9 三启动子功能区与 *barnase* 基因融合构建的不育基因以农杆菌介导法对棉花下胚轴进行了遗传转化, 通过胚状体途径获得了转基因再生植株。利用 150 mg · L⁻¹ 高浓度卡那霉素(Km)对转化初期筛选出的再生苗进行再次筛选, 提高了转化株的选出率。通过 PCR 检测和 Southern dot blot 分析从转基因胚状体再生植株中获得了带有 *barnase* 不育基因的 120 株转基因植株。进行转基因植株生物学性状检测和观察表明, 所获得的转基因植株对溴苯腈表现出了明显的抗性, 并从不育基因转化植株中筛选出了具有明显不育特征的雄性不育株。

关键词:棉花; 雄性不育; 遗传转化; *barnase* 基因

中图分类号: S562.035.3 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2007)04-0261-06

Cotton Genetic Transformation of *Barnase* Male Sterility Gene

ZHANG Hui-jun¹, WANG Huan-yu², SHI Yue-jin¹, ZHANG Yu-man², YUE Jian-xiong¹, WU Shen-jie¹, ZHU Yong-hong¹, LIU Yu-le², YANG Huai-yi^{2*}

(1. Institute of Cotton, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuncheng, Shanxi 044000, China; 2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Cotton male sterility mutations naturally have been proved to be useful for producing hybrids. Crosses between cotton lines often result in progeny with higher hybrid vigor. However, the hybrid production has been limited because there is no ideal fertility restoration variety. The establishment of genetic engineering strategy of male sterility and fertility restoration varieties has facilitated the development of breeding system for hybrid cotton. To obtain genetic modified male sterile cotton, the chimaeric male sterile gene which was constructed via placing the ribonuclease *barnase* under the control of anther-specific promoter was used to transform hypocotyledonary axis of cotton via *Agrobacterium tumefaciens*. Embryoids were generated from transformed calli and then developed to seedling. 150 mg · L⁻¹ Kanamycin was used for selecting positive transgenic seedling from the primary one from embryoids and many negative transgenic seedlings were screened out. 120 lines of transgenic male sterility were identified via PCR and Southern dot blotting. 69 lines of the identified transgenic plants were conferred a resistance to bromoxynil and male-sterile traits, however, only 6 lines showed significantly male-sterile traits.

Key words: cotton; male sterility; genetic transformation; *barnase* gene

目前, 虽已从棉花中克隆出了许多基因, 但主要集中在纤维品质、抗逆、棉酚相关、发育相关基

因等方面^[1], 还未见有关育性基因克隆的报道。利用不同手段进行棉花特异种质资源创造和培育对进行棉花遗传研究、图谱构建、基因定位和功能

收稿日期: 2006-10-25

作者简介: 张慧军(1965-), 女, 助理研究员, 硕士, sjhuij@sohu.com; * 通讯作者: yanghy@sun.im.ac.cn

基金项目: 国家 863 项目(2001AA212231)

基因组研究等具有重要的意义^[2]。近年来,植物基因工程技术的不断发展为人工创建棉花雄性不育材料提供了一种有效手段。

植物花药绒毡层在花粉发育过程中具有为小孢子提供营养、合成花粉外壁前体等重要作用,其遭到缺损或破坏将严重影响小孢子的发育。利用花药特异启动子在花药细胞中特异表达可破坏花药绒毡层细胞的基因,致使花粉发育受阻导致植物雄性不育。芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)中存在一种 *barnase* 基因,其编码产物为一具有水解 RNA 的核糖核酸酶^[3],Mariani 等利用从烟草中分离的组织特异性启动子(TA29)在花药中表达了该基因,于 1990 年获得了雄性不育的转基因烟草和油菜^[4]。为使获得的基因工程不育系育性得到恢复,Mariani 等又利用 TA29 启动子在花药中表达了核糖核酸酶 *barnase* 的抑制剂基因 *barstar*,于 1992 年获得了可使 *barnase* 基因诱导产生的不育系性状恢复良好的转化烟草和油菜的恢复系^[5]。目前,国内外许多试验室也都先

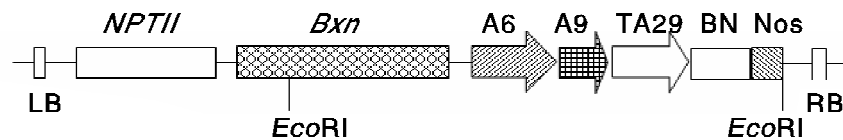
后开展了此方面的研究,获得了转基因的雄性不育烟草^[6]、油菜^[7-8]、水稻^[9]等。

在基因工程雄性不育及相应恢复系创建组织特异性启动子利用上,除利用从烟草中分离的花药绒毡层特异性启动子 TA29 外,从拟南芥分离到的 A6、A9 等花药特异性启动子也得到了广泛应用^[10-12]。为阐明利用基因工程技术创建雄性不育策略在棉花上的应用,本研究利用融合了 TA29、A6、A9 三启动子功能区与 *barnase* 构建的嵌合基因进行了棉花的遗传转化,获得了具有雄性不育性状的转基因植株。

1 材料和方法

1.1 植物材料、载体及菌种

用于农杆菌遗传转化的植物材料为晋棉 7 号,植物雄性不育表达载体为 pBin19-3pBN(中国发明专利 ZL 001 24829.4)(图 1),遗传转化工程菌为根癌农杆菌 EHA105(pBin19-3pBN)。



LB: 左边界; RB: 右边界; NPTII: 新霉素磷酸转移酶基因 II; Bxn: 抗溴苯腈的基因; A6: A6 启动子; A9: A9 启动子; TA29: TA29 启动子; BN: *barnase* 基因; Nos: Nos 终止子

图 1 植物雄性不育表达载体 pBin19-3pBN

Fig. 1 The construction of pBin19-3pBN for plant male sterility

1.2 酶和主要生化试剂

PCR 反应试剂盒、限制性内切酶、随机引物标记试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司产品,尼龙膜为 Bio-RAD 公司产品, α -³²P-dCTP 为福瑞生物工程公司产品,其它为国产分析纯试剂。

1.3 棉花的遗传转化与转基因植株的再生

1.3.1 棉花的遗传转化。棉花种子经硫酸脱绒后,用 70% 的酒精浸泡 1 min,30% 的 H₂O₂ 中浸泡 2~3 h,冲洗 3 次后无菌水中浸泡过夜。次日种子露白后接种于 1/2MS 培养基。25℃,2000 lx 光照下培养 5~7 d,取无菌苗的下胚轴作为外植体,利用根癌杆菌介导法进行遗传转化^[13]。

1.3.2 转基因植株的再生及移栽。将不育基因导入晋棉 7 号无菌苗下胚轴中获得愈伤组织,经继代培养及诱导获得胚性体,将分化良好的胚状体继代数次后得到再生植株。将发育良好的再生苗嫁接于大田推广品种的砧木上,嫁接成活后,移至温室或大田^[14]。

1.4 转基因植株的分子生物学检测

1.4.1 转基因植株基因组 DNA 的提取。取 0.5~1 g 棉花幼叶,在液氮中研碎后,进行棉花基因组 DNA 的提取^[15]。

1.4.2 转基因植株的 PCR 检测。据 Paddon 等报道的序列^[16],设计了用于 *barnase* 基因检测的引物: P1: 5'-CgggTACCATggCACAggTTATCAAC-3', P2: 5'-TCTAgAgCTCgAgTTATCT-gATCTTTgTAAAgg-3'。以 P1、P2 为引物,以提取的棉花总 DNA 为模板进行 PCR 检测,其具体条件为 94℃ 5 min,94℃ 60 s、55℃ 45 s、72℃ 1.5 min,30 个循环,72℃ 10 min。

1.4.3 转基因植株的 Southern dot blot 分析。取 10 μg DNA,通过点杂交仪将其印迹到带正电荷的尼龙膜,以随机引物法标记的 *barnase* 基因为探针,进行 Southern dot blot 分析^[17]。

1.5 转基因棉花的生物学测定

1.5.1 转基因植株抗溴苯腈的检测。将除草剂

溴苯腈配成 $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液涂抹棉花叶片,观察药害症状。

1.5.2 转基因植株育性检测。观察雄蕊发育状况,取花药刚裂开时的花朵,解剖剥离观察花器结构和花药散粉量并对花粉进行碘化钾染色鉴定其生活力。

2 结果与分析

2.1 转基因棉花再生植株的获得

以无菌苗下胚轴为外植体,农杆菌侵染共培养 48 h 后,将其转到 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Km 的筛选培养基上,当脱分化形成的愈伤组织长到蚕豆大小时转入分化培养基。由于长期使用卡那霉素会影响愈伤组织向胚状体的分化,为获得较高的转化率,当得到抗性愈伤后将其转到不含有 Km 的分化培养基中进行培养,继代 3~5 次后,可看到胚状体的形成(图 2A)。将分化良好的胚状体转到成苗培养基 42~70 d 可发育成小的幼苗(图 2B)。

由于获得的胚状体是在无筛选压力的分化培养基上形成的,为降低转化再生株的假阳性率,对获得的幼苗在 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Km 浓度的高选择压力下进行了再次筛选。在此选择压力下,逃逸株表现出了叶片白化、植株生长受阻并逐渐枯萎,而抗性植株生长发育良好(图 2C)。通过对转化再

生苗在高选择压力下的再次筛选,从 290 株再生苗中剔除了 95 株逃逸株,保证了转基因植株的阳性率。为提高转基因植株的获得率,利用嫁接繁殖法对获得的 195 株转基因试管苗进行了嫁接,将生长良好具有 6~7 片真叶的试管苗劈接于栽培品种砧木上,嫁接后 10 d 左右即可成活,成活后 14 d 即可直接移入大田,最后获得了 160 株生长健壮的转基因植株(图 2D)。

2.2 转基因棉花再生植株的分子生物学检测

经嫁接成活的植株,取新鲜幼叶提取基因组 DNA 后,首先利用 PCR 技术对不育基因 *barnase* 进行了检测。PCR 检测结果表明,在转基因植株中可检测到一 330 bp 的目的条带,而在对照非转基因植株中检测不到目的条带的扩增(图 3A),共从获得的 160 株嫁接成活苗中检出了 128 株带有目的基因的棉株,PCR 阳性检出率为 80%。

为克服 PCR 检测非特异性扩增造成的假阳性,进一步确定转基因植株携带的目的基因,以 *barnase* DNA 为探针对从抗性植株中提取的 DNA 进行了 Southern dot blot 分析(图 3 B),其结果与经 PCR 检测的结果基本一致,共获得了 Southern dot blot 结果阳性的 120 株转基因植株,检出阳性率为 75%。

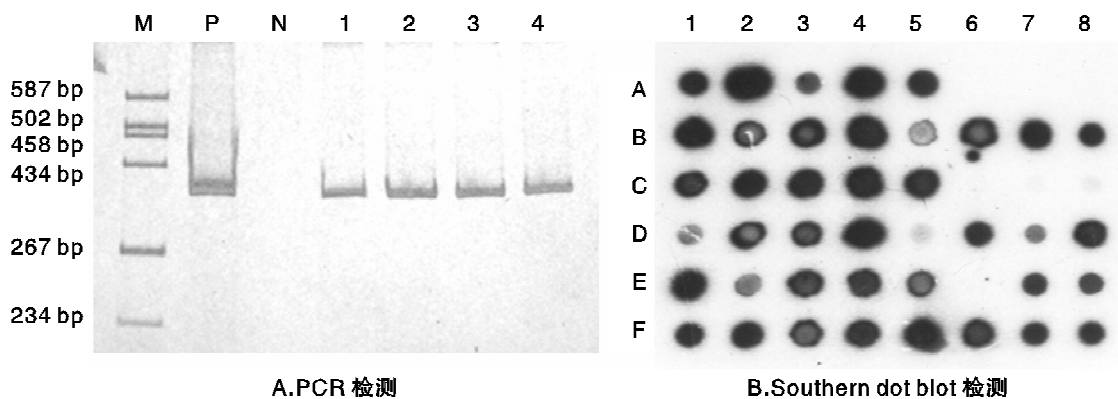


图 3A: M. pBR322/HaeIII DNA 标准, P. pBin19-3pBN 阳性对照, N. 非转基因的阴性对照, 1~4. 不同的转基因植株;
图 3B: A1、A2 为阳性对照, A7、A8 为非转基因的受体材料

图 3 转基因植株的 PCR 及 Southern dot blot 检测

Fig. 3 Identification of transgenic plants by PCR and Southern

2.3 转基因棉花对溴苯腈的抗性及其雄性不育性状的分析

2.3.1 转基因植株对溴苯腈抗性的检测。由于通过基因工程技术创建的雄性不育材料所表现的性状在遗传上为一显性性状,无法通过筛选或自交途径获得纯和的显性不育系,其基因型为异质

杂合型。在不育性状保持过程中,其后代会发生分离,仅 50% 的植株表现为不育。为保持不育材料的一致性,在载体构建时,连锁构建了 *Bxn* 基因,以赋予转基因植株抗溴苯腈的能力,从而通过喷施溴苯腈杀死育性恢复植株,使不育材料得到保持。

由于溴苯腈是一种植物光系统 II 破坏剂,在植物体内的传导性差,研究采用涂抹试验对转基因植株进行了抗溴苯腈的检测。结果表明,阳性转基因植株对溴苯腈表现出了明显的抗性,而对照株在溴苯腈浓度为 $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时即表现出了叶片失绿枯黄并继而死亡的症状(图 4)。转基因植株抗溴苯腈的检测也进一步证明了雄性不育基因 *barnase* 已整合到了棉花染色体基因组中。

2.3.2 *Barnase* 转基因棉花雄性不育性状的生物学检测。通过对雄性不育转基因棉花植株生长、花器结构、花粉生活力等生物学特征进行观察发现,转基因植株和对照相比在植株生长、叶片发育、生育期等方面无明显差异,但在花器发育、花粉生活力上表现出了明显的差异。共从 120 株 Southern dot blot 阳性的植株中检出了 69 株雄蕊发育异常株,其育性结果与抗溴苯腈检测结果相一致。其中有 6 株表现出了花丝变短、柱头相对突出(图 5 A)、花药干瘪无法正常开裂(图 5B)等明显的雄性不育特征,而其它植株不育性状表现不很明显。以 0.5% 的 KI-I 对具有明显雄性不育特征的花粉进行检测,结果表明其花粉活力低下,仅有个别花粉染色较深(图 5 C),花粉不育率达到了 95% 以上。将获得的 6 株雄性不育特征明显的 T_0 代植株与高产优质的晋棉 25 号杂交获得的 F_1 中抗溴苯腈的植株也表现出了明显的雄性不育性状,这一结果进一步表明,转基因获得的雄性不育特征是由导入的 *barnase* 基因所致,并非为组织培养过程中变异所致。

3 讨论

棉花遗传转化率低,所需时间长,在一定程度上给基因工程技术在棉花上的应用带来了困难。为提高转化率,减少 Km 对胚状体分化的影响,本研究在愈伤组织向胚状体分化过程中去除了 Km,这在很大程度上提高了胚状体的形成率,但同时也增加了假阳性率。在获得胚状体幼苗后,在 Km 浓度为 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的高选择压下对其进行再次筛选,既提高了转化过程中胚状体的形成率又保证了其阳性率,减少了大量的后续工作,取得了良好的效果。

虽然在试验中获得到了大量的转基因植株,

但仅个别植株(6/120)表现出了明显的不育性状,不同转基因植株间不育性状及不育程度表现出了明显的差异。同时,在 T_1 代性状观察中发现,获得的转基因不育材料的不育性状,在不同时期开放的花朵中,表现并不一致,表现出了一定的高温敏感性。这与 Martine 等^[18]、李胜国等^[6]在转基因烟草中观察到的结果相一致。然而,对造成转基因植物温度敏感性的因素,至今仍无明确的认识。由于棉花花期正处于高温生长季,与油菜等花期温度较低的类型相比,这给获得理想的温度不育材料增加了较大的难度。故为克服不育性状受高温影响的现象,需加大转化力度获得较多的转基因植株,从中筛选出不育性状表现良好,遗传稳定,不受温度影响或受温度影响较低的转基因植株。

致谢:

本研究得到了中科院微生物研究所田波院士的指导和帮助,特此致谢。

参考文献:

- [1] 胡根海, 喻树迅. 棉花基因克隆研究进展[J]. 棉花学报, 2005, 17 (4): 240-244.
- [2] 周宝良, 张天真. 棉花特异种质资源的创造与利用研究[J]. 棉花学报, 2005, 17(5): 304-308.
- [3] HARTLEY R W. *Barnase* and *barstar*: expression of its cloned inhibitor permits expression of a cloned ribonuclease [J]. Journal of Molecular Biology, 1988, 202(4): 913-915.
- [4] MARIANI C, Beuckeleer M D, Truettner J, et al. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene [J]. Nature, 1990, 347 (6295): 737-741.
- [5] MARIANI C, Gossele V, Beuckeleer M D, et al. A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants [J]. Nature, 1992, 357(6377): 384-387.
- [6] 李胜国, 刘玉乐, 朱 峰, 等. 基因工程雄性不育烟草的获得[J]. 植物学报, 1995, 37(8): 659-660.
- [7] 钟 蓉, 刘玉乐, 朱 峰, 等. TA29-*Barnase* 基因导致油菜雄性不育的研究[J]. 植物学报, 1996, 38 (7): 582-585.
- [8] 彭仁旺, 周雪荣, 王峻岭, 等. 表达 *barstar* 基因及 *bar* 基因的转基因油菜的研究[J]. 遗传学报, 1998,

- 25(1):74.
- [9] 陆桂华, 孙海涛, 张景六, 等. 由 *RTS-barnase* 嵌合基因的表达导致的雄性不育水稻植株[J]. 植物生理学报, 2000, 26(2):171-176.
- [10] HIRDD L, Worrall D, Hodge R, et al. The anther-specific protein encoded by the *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* A6 gene displays similarity to β -1,3-glucanases [J]. Plant Journal, 1993, 4:1023-1033.
- [11] PAUL W, Hodge R, Smartt S, et al. The isolation and characterization of the tapetum-specific *Arabidopsis thaliana* A9 gene [J]. Plant Molecular Biology, 1992, 19: 611-622.
- [12] 马宏, 王寰宇, 刘玉乐, 等. 拟南芥花药特异启动子启动的 *Barnase* 基因在烟草中的表达[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(2):144-147.
- [13] 陈志贤, Llewellyn D J, 范云六, 等. 利用农杆菌介导法转移 *tfdA* 基因获得可遗传的抗 2,4-D 棉株 [J]. 中国农业科学, 1994, 27(2): 31-37.
- [14] 王伟, 陈宛新, 朱祯, 等. 转基因棉花高效定植方法的研究[J]. 植物学报, 1999, 41(10): 1072-1075.
- [15] CHAUDHRY B, Yasmeeen A, Husnain T, et al. Mini-scale genomic DNA extraction from cotton [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1999, 17: 1-7.
- [16] PADDON C J, Hartley R W. Cloning, sequencing and transcription of an inactivated copy of *Bacillus amyloliquefaciens* extracellular ribonuclease (*barnase*) [J]. Gene, 1985, 40(2-3):231-239.
- [17] SAMBROOK J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 33-62.
- [18] MARTINE D, Delourme R, Gourret J, et al. Expression of engineered nuclear sterility in *Brassica napus* [J]. Plant Physiology, 1993, 101:1295-1304.
-