

# 以基因枪介导获转 *ps1-barnase* 基因的 工程雄性不育水稻植株

凌定厚<sup>1</sup> 陶利珍<sup>1</sup> 马镇荣<sup>1</sup> S P Zhang<sup>2</sup> S K Datta<sup>3</sup>

(1 中国科学院华南植物研究所 广州 510650)

(2 International Laboratory for Tropical Agricultural Biotechnology USA)

(3 International Rice Research Institute Manila Philippines)

**摘要** 以 *ps1-barnase(brn)* 为目的基因, *pHcintG(PG)* 为选择 / 标记基因进行共转化, 以 PDS-1000-氮气基因枪介导, 将 *brn* 及 *PG* 基因转化到水稻台北 309 及秋光的核 DNA 中, 得到了转 *ps1-barnase* 基因的工程雄性不育植株。以悬浮细胞作为基因枪轰击的靶材料, 转化植株再生频率较初级愈伤组织的为高。转 *brn* 基因植株的其他主要性状与供体亲本无显著差异, 但却表现不育。其不育的程度在不同的植株之间表现不同。在转 *brn* 基因植株中观察到全不育(占全部 *brn* 阳性植株的 40.6%)、高不育(占 15.6%)及半不育的个体(占 43.7%)。全不育的转基因植株自交完全不能结实(结实率为零), 除个别植株外, 花粉完全不被 I-KI 染色; 而人工授以正常的花粉则可以获得杂交种子。而 *brn* 基因的阴性植株及未进行转化的对照植株则完全可育, 表明转基因植株之雄性不育乃 *brn* 基因所致。结果表明, *brn* 基因在水稻中是完全可以正常表达的, 其表达的时期推测在花粉母细胞减数分裂前至花粉形成之间的整个时期。

**关键词** *barnase* 基因, 雄性不育, 遗传转化, 水稻

**分类号** Q 943

自 70 年代以来, 我国水稻杂种优势利用无论在社会效益还是在经济效益方面均取得巨大的成就。就杂交水稻的生产而言, 当前我国杂交水稻所使用的母本(三系杂种为 CMS 细胞质雄性不育系; 二系杂种为 PMS, 光 / 温敏雄性不育系)均有各自的局限性。在三系杂种方面, 由于恢保关系的限制, 具恢复能力的品种为数不多; 两系杂种特别是籼稻的, 更是由于不育系不稳定而且主要对温度敏感, 在生产上使用时要冒一定的风险, 这些因素均限制了各自的应用<sup>[1]</sup>。在三系杂交水稻方面, 长期以来人们从各方面诱发雄性不育突变, 以建立多元化的细胞质源的不育系来解决这一问题, 如钴 60 射线、体细胞无性系变异<sup>[2,3]</sup>及原生质体融合<sup>[4]</sup>。运用遗传转化技术诱发雄性不育, 为开发杂种种子的生产的一崭新的途径<sup>[5]</sup>。由 *Bacillus amyloliquefaciens* 克隆的 RNA 酶基因——*barnase* 可用于诱导农作物工程雄性不育。Mariani 等将花药绒毡层启动子 (*TA29*) 与 RNA 酶基因 *barnase*

本文于 1997-03-04 收到, 1997-06-23 修回

本研究获国家自然科学基金(30470445), 广东省自然科学基金(940496)及美国 Rockefeller Foundation(1994-0001-02420)资助

拼接 (*TA29-barnase*) 并转入烟草与油菜, 获得这两个作物的工程雄性不育植株<sup>[6]</sup>。随后他们将 RNA 酶抑制基因 (*barstar*) 与 *TA29* 构建成 *barnase* 基因的恢复基因 *TA29-barstar*。转恢复基因 (*TA29-barstar*) 的烟草与油菜能使工程雄性不育植株 (*TA29-barnase*) 的育性得以恢复<sup>[7,8,9]</sup>。除花药绒毡层启动子外, Zou 等以花粉启动子 (pollen specific promoter) 与 *barnase* 构建了 *ps1-barnase* 基因<sup>[10]</sup>。Zhan 等将 *ps1-barnase* 基因转入烟草亦获得了雄性不育植株<sup>[11]</sup>。Curtis 等 1996<sup>[12]</sup> 以 *glucanase* 拼接花药绒毡层启动子基因, 用农杆菌介导获得莴苣工程雄性不育植株。在国内, 彭仁旺等<sup>[13]</sup> 1996 以农杆菌转化法将 *TA29-barnase* 基因导入油菜获得雄性不育植株。迄今在国内外, 尚未见有水稻工程雄性不育植株的报道。我们以基因枪介导, 获得 *ps1-barnase* 阳性转基因的水稻雄性不育植株, 本文报道这一研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 品种

本实验所使用的品种有粳稻台北 309、秋光及籼稻青油粘、新锦粘、IR72、basmati-1 等。但本文仅报道粳稻的实验结果。籼稻的结果将另文报道。

### 1.2 外植体及靶材料

以初级愈伤及悬浮细胞为靶材料进行轰击, 并比较了这两种材料的转化效果。以成熟去壳种子为外植体, 培养于 MS 培养基附加 2,4-D 2mg/L 中, 以诱导愈伤组织。以此培养基上培养约 30 天的初级愈伤, 或继代培养 1 次 (约 30 天) 的初级继代愈伤作为靶材料, 供基因枪轰击用。在初级愈伤中挑选结构致密的胚性愈伤组织, 在 R2<sup>[14]</sup> 培养基中作悬浮培养。为建立胚性悬浮细胞系, 悬浮细胞在水平摇床上不断摇动 (转速 120rpm), 每 7 天继代培养 1 次。建立适用于基因枪轰击之再生能力高的胚性悬浮细胞系所需的时间约为 1~3 个月, 依品种不同而异。结构良好的胚性悬浮细胞具有浓密的细胞质, 白或乳白色, 颗粒大小均匀, 生长旺盛。这时, 在更换新培养基后第 3 天收集细胞作轰击之用。

### 1.3 质粒 DNA

实验使用的质粒为 *ps1-barnase* (简称 *brn*) 及 *pHcintG*。 *ps1-barnase* 由 Dr. Alice Cheung (Yale University, USA) 提供。其结构如图 1 所示。它为水稻花粉启动子 (pollen specific promoter) 与 RNA 酶基因 (*barnase*) 拼接而成。由于花粉启动子的作用, RNA 酶只在花粉形成时表达, 而对其他性状没有影响。质粒 *pHcintG* 由 Dr. Futerer (ETH Zurich)

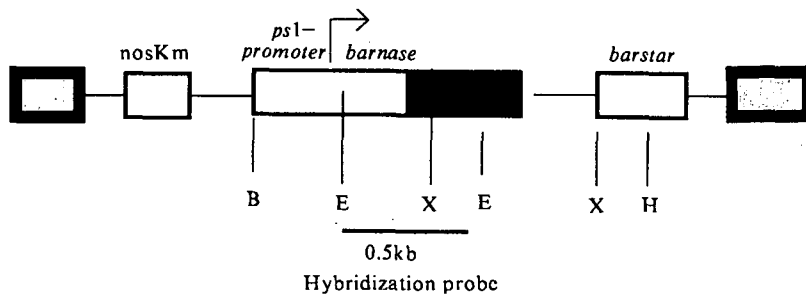


图1 质粒 *ps1-barnase* 的结构图

Fig.1 The structure of *ps1-barnase* plasmid

B: *Bam*HI; E: *Eco*RI; X: *Xba*I; H: *Hind*III

提供,含有标记基因 *Gus* 及潮霉素磷酸转移酶基因 (*hph*),后者作为选择标记用。

#### 1.4 转化

将  $ps1-barnase$  及  $pHcintG$  DNA 与金粉充分混合,进行轰击作共转化。两质粒的比例为 3~4 ( $barnase$ ):1 ( $pHcintG$ )。外源基因以基因枪 [Biolistic PDS-1000 / He Particle Delivery System (BIO-RAD)] 介导,将与金粉混合的 DNA 射入靶材料的细胞内。在轰击前,以高渗透压对靶材料作前处理。高渗透压的培养基中加入了甘露醇、山梨醇及蔗糖各 3%,轰击前一天将靶材料转入高渗透压的培养基中预处理 24h。

#### 1.5 选择压及抗性克隆

以潮霉素 (Hygromycin) 为选择因子进行选择。以初级愈伤及悬浮细胞为对象的靶材料,在轰击后立即在 50mg / L Hygromycin 的选择压下进行选择。在选择压的作用下,大多数未转化的细胞不能继续生长渐渐死亡,而转化了的细胞在这一条件下能继续正常地生长。经过反复而多次地筛选,直至在这种强选择压下抗性克隆能正常生长。

#### 1.6 植株再生

植株再生培养基为 MS 附加 BAP 2mg / L、激动素 0.1mg / L 及 NAA 2mg / L,并含有 Hygromycin 50mg / L。在选择条件下经一系列选择后,发育良好具胚性结构的抗性克隆用于植株再生。先将它们作干燥处理,即转入具有灭过菌的干滤纸上,在培养皿中置于光照条件下 24~48h,然后转入分化培养基,在光照条件下进行分化培养。

#### 1.7 DNA 提取及 Southern blot 分析

从推定转基因植株及对照亲本的叶片中提取总 DNA,每株上采 5~10cm 的健康叶片 5 片,在液氮及冰冻条件下,用研钵仔细研磨至粉碎,CTAB 法提取<sup>[15]</sup>。在 RNA 酶消化样品中所含的 RNA 后,用分光光度计测 DNA 的含量,以质粒 DNA 及未转化植株的 DNA 分别为正负对照。对所有样品以 *Bam*HI 进行酶切。在 0.8% 的琼脂糖胶条件下分别电泳,每一独立转化植株为一个样品,取 0.5 $\mu$ g DNA 电泳。将 DNA 转至 Hybond-N 尼龙膜,以 ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P) dATP 标记探针<sup>[16]</sup>。 $ps1-barnase$  探针为 0.5kb *Bam*HI 片段,而 *hph* 基因的探针为 1.1kb *Bam*HI 片段组成,分别包括了  $ps1-barnase$  基因及 *hph* 基因的编码序列。以 Sambrook<sup>[17]</sup> 法进行分子杂交。第一次的杂交曝光后,将 Hybond-N 尼龙膜上的旧探针洗净,以第 2 个质粒的探针进行另一次杂交。

#### 1.8 转基因植株的性状表达

1.8.1 *Gus* 基因组织化学的生物鉴定 以 Jefferson 法<sup>[18]</sup>对  $T_0$  植株的叶片、花药、根及节等器官进行 *Gus* 组织化学染色。染色的材料置于 37 $^{\circ}$ C 下过夜。

1.8.2 鉴别转基因植株的育性标准 判断转基因植株的育性以种子结实率为主要标准并参考花粉的育性。花粉育性以 1% I-KI 溶液染色鉴定。推定转基因再生植株 (以  $T_0$  表示) 的花粉完全不被 1% I-KI 溶液染色,在套袋自交的条件下不能结实 (结实率为零),或花粉虽可被染色,但自交亦不结实 (结实率为零),属于完全不育。在自交条件下,结实率低下,结实率在 10% 以下,属于高不育;自交结实率在 10% 以上 50% 以下,属于半不育。结实率在 70% 以上者属正常可育。

#### 1.9 测交

为了确定不育的推定转基因植株的雌性器官是否正常,即是否属于雄性不育,对在自

交条件下完全不结实的植株进行了测交。以来自对照品种的正常花粉为父本,与之授粉进行杂交。这种推定转基因不育株,只有在测交的情况下能形成种子者才被认为是雄性不育的。本实验仅对自交完全不育及部分高不育的  $T_0$  植株进行了测交。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同靶材料对植株再生效率的影响

表1比较了初级愈伤与悬浮细胞两种靶材料的推定转基因植株的植株再生效率。从表1可见,无论是以供轰击的靶材料为基数计算还是以转入再生培养时的抗性克隆为基数计算,在两个品种中均一致地表现出以悬浮细胞为靶材料的较初级愈伤的为高。前者为11.1%与58.9%(台北309)及12.9%与33.3%(秋光),后者分别为6.7与30.2%及6.9与12.0%。这是因为良好结构的胚性悬浮细胞系具有更高的植株再生能力。不仅如此,以胚性悬浮细胞为靶材料进行遗传转化,除了再生能力强以外,还能在较短的时间内获得大量的靶材料供轰击之用。其优点是明显的。

表1 不同靶组织的植株再生效率

Table 1 The efficiency of plant regeneration on different target tissues

品种 Variety	靶组织 Target tissue	外植体数 No. of explant	抗性克隆数 No. of R-clone	再生植株数 No. of regenerated plant	植株再生效率 Efficiency of plant regeneration (%)	
					以1为基数 Based on 1	以2为基数 Based on 2
		(1*)	(2)	(3)	(3/1)	(3/2)
台北309	愈伤 Callus	240	53	16	6.7	30.2
TP309	悬浮细胞 Suspension cell	208	39	23	11.1	58.9
秋光	愈伤 Callus	159	92	11	6.9	12.0
Qui Guang	悬浮细胞 Suspension cell	194	75	25	12.9	33.3

Note: R-clone=Resistant clone, TP309=Tai Pei 309

植株再生效率(%)=再生植株数/外植体数或抗性克隆数×100

Efficiency of plant regeneration (%)=No. of regenerated plant/No. of explant or resistant clone ×100

\*为各栏的代号(The code of each column)

### 2.2 选择与共转化效率

在两个品种中共获40株推定转基因植株,其中31株为 *hph* 阳性,占总数的77.5%,9株为 *hph* 阴性,占22.5%(表2)。这一数字显示了50mg/L Hygromycin的选择效率接近80%。在这40株推定转基因植株中,*ps1-barnase* 阳性共有32株,较 *hph* 阳性还多1株。*hph* 与 *brn* 两基因共转化的效率,在台北309为100%,秋光为106.3%(表2最后一栏,4/2栏)。这是因为在两个品种的转基因植株中,有的个体为 *brn* 阳性而同时却为 *hph* 阴性之故(表3及表4)。这表明有些克隆为目的基因所转化但却未能被选择基因 *hph* 转化,而同时在选择过程中漏了网,逃脱了选择压的作用。

### 2.3 *Gus* 基因在 $T_0$ 植株中的表达

虽然质粒 *pHcintG* 中含有 *hph* 及 *Gus* 基因,在转基因植株中,这两个基因的转化与表达行为并不总是一致的。如在秋光的21株推定转基因植株中,*hph* 基因阳性植株有16株,其中15株为 *Gus* 阳性(表2及表4),显示它们的转化与表达基本上是一致的。但在台北

表2 基因枪法转化 *brn* 与 *hph* 基因的共转化效率<sup>1)</sup>Table 2 The efficiency for co-transformation by bombardment with *brn* and *hph* gene<sup>1)</sup>

品种 Variety	植株数 Total plant (1) <sup>3)</sup>	观察植株数及相应的频率 No. of observed plant and the corresponding frequency %						<i>brn</i> 基因的共转化效率 Co-transformation of <i>brn</i> gene <sup>2)</sup> (4/2, %)
		<i>hph</i> <sup>+</sup> (2)	<i>hph</i> <sup>-</sup> (2)	<i>Gus</i> <sup>+</sup> (3)	<i>Gus</i> <sup>-</sup> (3)	<i>brn</i> <sup>+</sup> (4)	<i>brn</i> <sup>-</sup> (4)	
台北309 TP309	19	15(78.9)	4(21.1)	7(36.8)	12(63.2)	15(78.9)	4(21.1)	100
秋光 Qiu Guang	21	16(76.2)	5(23.8)	15(71.4)	6(38.6)	17(80.9)	4(19.1)	106.3
合计 Total	40	31(77.5)	9(22.5)	22(55)	18(45)	32(80)	8(20)	103.3

1) + 表示有关基因的阳性(Positive plant corresponding gene); - 表示有关基因的阴性(Negative plant corresponding gene), 括号内的数字为各观察数占其相应总数的百分数(The figures in the brackets refereed the corresponding frequency of the observation)

2) *brn* 基因的共转化效率 % = *brn*<sup>+</sup> 植株数 / *hph*<sup>+</sup> 植株数 × 100 (The efficiency of co-transformation of *brn* gene % = No. of plant with *brn*<sup>+</sup> / No. of plant with *hph*<sup>+</sup> × 100)

3) 为各栏的代号(The code of each column)

表3 台北309转基因植株Southern blot分析及育性表达

Table 3 Southern blot analysis and sterile expression of T<sub>0</sub> plant in Tai Pei 309

株号 Code of plant	花粉染色 Pollen staining %	种子结实% Seed setting 自交 Slfd <sup>1)</sup>	杂交 Pllnd <sup>2)</sup>	Southern blot analysis <i>Gus hph brn</i>	育性 Fertility 分类	株号 Code of plant	花粉染色 Pollen staining %	种子结实% Seed setting 自交 Slfd <sup>1)</sup>	杂交 Pllnd <sup>2)</sup>	Southern blot analysis <i>Gus hph brn</i>	育性 Fertility 分类
TP1	75.4	21.5		- + +	半育 semi	TP11	32.4	7.6		- + +	高不育 high
TP2	80.5	76.3		- - -	可育 fertile	TP12	74.3	5.6		- + +	高不育 high
TP3	80.8	44.2		- + -	半育 semi	TP13	84.6	21.1		- + +	半育 semi
TP4	74.3	45.6		+ + +	半育 semi	TP15	0	0	24.6	- + +	全不育 pure
TP5	15.4	10.4		+ + +	高不育 high	TP18				- + +	未抽穗 No.head
TP6	27.4	29.5		+ - +	半育 semi	TP19	1.5	4.6	21.5	- + +	高不育 high
TP7	89.0	70.8		- - -	可育 fertile	TP20	0	0	14.7	+ + +	全不育 pure
TP8	0	0	20.5	+ + +	全不育 pure	TP21	16.4	46.2		+ + +	半育 semi
TP9	42.2	54.6		- + +	半育 semi	TP45	75.3	78.5		+ - -	可育 fertile
TP10	53.2	0	21.6	- + +	全不育 pure	CK	93.5	84.4		- - -	可育 fertile

1) Slfd= Self pollination; 2) Pllnd= Pollinated by hand controlling

309, 在 19 株推定转基因植株中, *hph* 阳性的有 15 株, 而这 15 株中, 具 *Gus* 阳性反应的只有 5 株, 另外 10 株则为 *Gus* 的阴性反应(表 3)。这个品种具 *Gus* 阳性的共有 7 株, 其中只有 5 株为 *hph* 阳性(表 2 与 3), 另外两株则为 *hph* 阴性, 表明在台北 309 这两个基因的表达很不一致。在 *Gus* 阳性转基因植株中不同的器官均显示特殊的 *Gus* (蓝色) 反应。

#### 2.4 推定转基因植株的分子鉴定

对台北 309 及秋光两品种 40 株推定转基因植株进行了 *brn* 与 *hph* 两基因的 Southern blot 分析。分子检测的结果如图版 I-1~3 所示。在 3 个基因中, 以 *Gus* 阳性转基因植株的频率较低, 仅为 55%(表 2)。*hph* 及 *barnase* 两基因阳性转基因植株的频率均在 70% 以

上。

表 4 秋光转基因植株Southern blot分析及育性表达

Table 4 Southern blot analysis and sterile expression of T<sub>0</sub> plants in Qiu Guang

株号 Code of plant	花粉染色 Pollen staining %	种子结实% Seed setting 自交 Slfd <sup>1)</sup>	杂交 Pllnd <sup>2)</sup>	Southern blot analysis Gus hph brn	育性 Fertility 分类	株号 Code of plant	花粉染色 Pollen staining %	种子结实% Seed setting 自交 Slfd <sup>1)</sup>	杂交 Pllnd <sup>2)</sup>	Southern blot analysis Gus hph brn	育性 Fertility 分类				
Q1	79.2	0		+	+	+	全不育 pure	Q11	60.1	52.5		+	+	+	半育 semi
Q2	0	0	15.6	+	+	+	全不育 pure	Q12	8.4	5.3	60.5	+	+	+	高不育 high
Q3	74.7	67.8		-	-	-	可育 fertile	Q13	0	0	12.5	+	+	+	全不育 pure
Q4	8.4	0	8.3	+	+	+	全不育 pure	Q14	0	0	9.8	+	+	+	全不育 pure
Q5	82.6	0		+	+	+	全不育 pure	Q15	80.8	85.7		+	+	-	可育 fertile
Q6	93.6	81.3		-	-	-	可育 fertile	Q16	80.5	29.8		+	+	+	半育 semi
Q7	0	0	18.6	-	-	+	全不育 pure	Q18	61.5	28.8		+	+	+	半育 semi
Q7-1	13.2	21.3		+	+	+	半育 semi	Q19	43.5	18.6		+	+	+	半育 semi
Q8	86.5	84.3		-	-	-	可育 fertile	Q20	35.3	28.5		-	+	+	半育 semi
Q9	0	0	70.2	+	+	+	全不育 pure	Q21	21.4	19.4		+	+	+	半育 semi
Q9-1	0	0	50.8	+	+	+	全不育 pure	CK	93.5	84.4		-	-	-	可育 fertile

1) Slfd= Self pollination; 2) Pllnd= Pollinated by hand controlling

2.4.1 台北 309 对 19 株推定转基因植株进行了分子检测,其中 *hph* 与 *brn* 两基因的阳性植株均为 15 株,占 78.9%。但在各自 1.1kb 及 0.5kb 编码序列被标记上的仅分别有 7 株与 8 株,近一半的转基因植株虽为阳性,但在这一关键位置没有任何标记。大多数转基因植株为多拷贝整合(图版 I-2~3)。在这个品种中,绝大多数植株同时为这两个基因的阳性,但有 1 株(TP6,表 3)为 *brn* 阳性而却为 *hph* 阴性(图版 I-2,3)。

2.4.2 秋光 21 株被检测的推定转基因植株中阳性有 17 株,占 80.9%,其中在 0.5kb 编码序列显示出明显标记有 11 株(图版 I-4)。有 1 株(Q7,表 4)为 *brn* 阳性而却为 *hph* 阴性。这导致 *brn* 阳性植株多于 *hph* 的,从而使共转化率大于 100%。有 3 株(19、20 及 21,图版 I-3)仅在高分子量区有明显的杂交带,这种杂交带好像未被酶切过似的。分子杂交的结果显示多数植株的杂交带亦为多拷贝。*psl-barnase* 阴性 5 株,占 24%。

## 2.5 转基因植株的特点

在转基因植株中,除少数植株的株高略有下降及 1 株未抽穗(TP18,表 3)以外,*barnase* 阳性转基因植株营养体的主要性状与供体亲本基本上是一致的。如株型、穗粒等形态特征,生育期、光温反应等生理特性。但是它们的育性则发生了极大的变化。在台北 309 及秋光两品种中获 *barnase* 阳性转基因植株 32 株。在这 32 株中没有 1 株是完全可育的(结实率在 70% 以上,表 5),它们的育性均有不同程度的下降。但其雄性器官与雌性器官的育性表现极不相同。

2.5.1 *barnase* 阳性转基因植株雄性器官的育性 根据 *brn* 阳性转基因植株的不育程度,可将它们分为完全雄性不育、高不育与半不育 3 类。属于全不育的 *brn* 阳性转基因植株,花药较小且不能裂开(图版 I-6),绝大多数植株的花粉瘪皱且不规则(版图 I-4)完全

表5  $ps1-barnase$ 基因阳性及阴性植株的育性比较Table 5 Sterile expression of regenerated plants positive and negative for  $brn$  gene

品种 Variety	植株性质 Character of plant	雄性不育类别 Type of male sterile				合计 Total
		全不育 Pure	高不育 High	半不育 Semi	可育 Fertile	
秋光	阳性 positive	9	1	7	0	17
Qui Guang	阴性 negative	0	0	0	4	4
台北309	阳性 positive	4	4	7	0	15
Tai Pei 309	阴性 negative	0	0	1	3	4
合计	阳性 positive	13	5	14	0	32
Total	阴性 negative	0	0	1	7	8

不为 I-KI 染色 (图版 I-5)。没有受精的功能, 在自交条件下完全不能结实 (图版 I-7), 因而其雄性器官是败育的。全不育的转基因植株占  $barnase$  阳性植株之总数的 26.7% (台北 309) 及 52.9% (秋光, 表 5)。在完全不育的  $barnase$  阳性转基因植株中, 有个别植株的花粉亦可被 I-KI 染色, 如台北 309 的 TP10 (表 3) 与秋光的 Q5 (表 4), 花粉染色率分别为 53.2% 与 82.6%, 但即使有 82.6% 的花粉是着色的, 它们在自交条件下仍然不育, 表明它们的花粉也是无功能的。高度雄性不育与半不育分别占  $barnase$  阳性转基因植株总数的 5.8% 与 41.3% (秋光) 及 26.7% 与 46.6% (台北 309, 表 5)。

2.5.2  $barnase$  阳性转基因植株雌性器官的育性 对大多数完全不育及部分高不育的  $brn$  阳性转基因植株进行了测交, 所有被测交的植株均获得了杂交种子 (图版 I-8)。杂交结实频率低者为 8.3% (Q3, 表 4), 高者达 70.2% (Q9, 表 4), 表明  $brn$  阳性转基因植株的雌性器官是正常可育的。由此可知  $brn$  阳性转基因植株在自交的条件下不能结实, 当人工授以正常的花粉时则可以结实, 充分证明它们是雄性不育的。

## 2.6 $barnase$ 阴性植株的育性

$brn$  的阴性植株可能未有任何基因被转入, 即对  $Gus$  与  $hph$  两基因为阴性者, 也可能为  $Gus$  及  $hph$  两基因或二者之一的阳性。这两类植株均遭受了与  $brn$  阳性转基因植株完全相同的处理, 可以把它们视为本实验中各种处理因子的对照组。属于后者的有 3 株 (TP3 及 TP45, 表 3 与 Q15, 表 4)。属前者的有 6 株 (TP2, 7, 表 3 及 Q3, 6, 7, 8, 表 4), 两类共 9 株。在这 9 株中, 没有发现 1 株是不育的, 除 1 株半不育, 结实率为 54.6% (TP3, 表 3) 外, 所有的  $brn$  阴性植株结实率都在 80% 以上 (表 3~5)。由此可见,  $brn$  的阴性植株及未作任何处理的对照 (供体品种) 植株均完全是可育的, 结实率在 80% 以上 (表 4, 5)。可以认为, 本实验所获得的高频率的雄性不育是由  $brn$  基因引起的。而那株半不育的植株可能为体细胞无性系变异所致<sup>[7, 8]</sup>。这一结果表明, 与对其他几种农作物一样,  $brn$  基因在水稻中也是可以正常表达的。用它来诱发水稻的雄性不育也是有效的。由  $brn$  基因诱导产生工程雄性不育虽然在烟草、油菜等作物上已获得成功, 但在水稻本实验乃属首例。本实验所获得的 3 种类型的雄性不育, 即全不育、高不育与半不育, 可能为  $brn$  基因表达的时间不一致所致。推测其表达的时间当从花粉母细胞减数分裂前到减数分裂后花粉粒形成的这一整个时期。如果在花粉母细胞减数分裂前表达, 则将产生完全雄性不育的个体, 如在花粉母细胞减数分裂后表达, 则产生从高不育至半不育等育性降低的个体。

Zhan 等 1995<sup>[11]</sup>对烟草也获得了相似的结果。这表明与花药绒毡层启动子 *TA29* 一样, 花粉启动子 *ps1* 也可以诱导完全的雄性不育, 从而可以运用于农作物杂种种子的生产上。

致谢 Dr. Alice Cheung (美国 Yale 大学, 现在在 Massachusetts 大学) 及 Dr. J. Futterer (瑞士 ETH) 分别为本实验提供 *ps1-barnase* 及 *pHcintG* 质粒 DNA, 特此致谢。

### 参 考 文 献

- 1 Lu X G, Zhang Z G, Maruyama K, Virmani S S. Current status of two-line method of hybrid rice breeding. In: Hybrid rice technology, Ed. by S S Virmani IRRI, Manila: 1994, 37~50
- 2 Ling D H, Chen W Y, Ma Z R, Chen M F. Male sterile mutant from somatic cell culture of rice, Theor. Appl. Genet., 1987, 75:127~131
- 3 Ling D H. *In vitro* production of male sterile rice plant. In: Biotechnology in agriculture and forestry, Ed. by YPS Bajaj, Vol. 36: Somaclonal variation in crop improvement II, Springer Berlin Heidelberg, New York: 1996, 20~45
- 4 Akagi H, Fujimura T. Construction of rice cybrid plants. Mol. Gen. Genet., 1989, 215:501~506
- 5 Strauss S H, Rottmann W H, Brunner A M, Sheppard L A. Genetic engineering of reproductive sterility in forest trees. Molecular Breeding, 1995, 1:5~26
- 6 Mariani C, De Beuckeleer M, Truettner J, Leeman J, Goldberg B R. Induction of male sterility in plant by a chimaeric ribonuclease gene. Nature, 1990, 347:737~741
- 7 Mariani C, Gossele V, Beuckeleer M, De Block M, Goldberg R B, Greef W, Leeman J. A chimaeric ribonuclease inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. Nature, 1992, 357:384~387
- 8 Denis M, Delourme R, Gourret J P, Mariani C, Renard M., Expression of engineered nuclear male sterility in *Brassica napus*. Plant Physiol., 1993, 107:1295~1304
- 9 De Block M, Dirk Debrouwer. Engineered fertility controls in transgenic *Brassica napus* L.: Histochemical analysis of anther development. Planta, 1993, 189:218~225
- 10 Zou J T, Zhan X Y, Wu H M, Cheung A Y. Characterization of a rice pollen-specific gene and its expression. Am. J. Bot., 1994, 81:552~561
- 11 Zhan X Y, Wu H M, Cheung A Y. Nuclear male sterility induced by pollen-specific expression of a ribonuclease. Sex Plant Reprod., 1996, 9:35~43
- 12 Curtis I, He S, Scott C P, Power R, Davey J B. Genomic male sterility in lettuce, a baseline for the production of F<sub>1</sub> hybrids. Plant Sci., 1996, 113, 113~119
- 13 彭仁旺等. 转基因雄性不育油菜选育简介. 遗传学报, 1996, 23(1):84
- 14 Ohira K, Ojima K, Fujimura A. Studies on the nutrition of rice cell culture I. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. Plant Cell Physiol., 1973, 14:1113~1121
- 15 Murray H G, Thompson, W F. Rapid isolation of high molecular weigh plant DNA. Nucl. Acids Res., 1980, 8:4321~4326
- 16 Feinberg A P, Vogelstein B (1983). A technique for radio labeling DNA restriction fragments to high specific activities. Annual Biochem., 1983, 13:6~13
- 17 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. In: Molecular Cloning: A laboratory manual (2nd ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. 1989
- 18 Jefferson, R A Kavanagh T A, Bevan M W. Gus fusion: B-Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in high plants, Embo. J., 1987, 6:3901~3907



## Engineered Male Sterile Transgenic Plants of Rice (*Oryza sativa* L.) with *ps1-barnase* Gene Transformation by Particle Bombardment

LING Ding-hou<sup>1)</sup> TAO Li-zhen<sup>1)</sup> MA Zhen-rong<sup>1)</sup> S P Zhang<sup>2)</sup> S K Datta<sup>3)</sup>

(1 South China Institute of Botany Academia Sinica Guangzhou 510650)

(2 International Laboratory for Tropical Agricultural Biotechnology USA)

(3 International Rice Research Institute Manila Philippines)

### Abstract

*Barnase-ps1* and *pHcintG* genes were co-transferred into rice genomic DNA, and engineering male sterile rice plants were induced in Tai Pei 309 and Qui Guang (*japonica* rice). Primary callus and suspension cells as the target tissues were bombarded by the particle bombardment of Biolistic PDS-1000 / He Particle Delivery System (BIO-RAD) with the plasmid DNA mixed to Gold Particle. The efficiency of regenerated plant from resistant clones in suspension cells was higher than that in primary callus.

In transgenic plants positive for *barnase-ps1* gene, three different level of male sterile were observed: complete male sterile making up 40.6% of the total transgenic plant positive *barnase* gene; high male sterile making up 15.6% and half male sterile making up 43.7%. The pollen grains in complete male sterile of transgenic plants were not stained by I-KI solution, shrunk and quite irregular in shape. No seed was set in the condition of self control pollination. When the normal pollens from wild type rice plants were pollinated on these transgenic male sterile plants, the hybrid seeds were set showing that the female organ of the ms plant was normal. Therefore these transgenic plants were demonstrated to be male sterile. The fertility of negative T<sub>0</sub> plants was normal, even though they were suffered all of the treatments like the positive plant. So the male sterile in positive transgenic plants was induced by *ps1-barnase* gene. This experiment demonstrated that the expression of *barnase-ps1* expressed gene in rice plant. It is hypothesized that the expressive stage of this gene might be from before meiosis of pollen mother cell to pollen formation after meiosis.

**Key words** Male sterile, *barnase* gene, Transformation, Rice

Received March 4, 1997, revision received June 23, 1997

This project was supported by National Natural Science Foundation of China (30470445);

Natural Science Foundation of Guangdong Province (940496) and Rockefeller

Foundation of USA (1994-0001-02420)

## 图 版 说 明

1~3: *ps1-barnase*及 *hph* 基因 Southern blot 分子检测, *ps1:ps1-barnase* 质粒 DNA, PG / *hph:pHintG* 质粒 DNA; (-): 负对照, 未转化植株的 DNA; 其他各列为相应测试的推定转基因植株。

1. 台北 309 的 *ps1* 基因 Southern blot, 标记分子量为 0.5kb. 其中 B1 与 B2 为籼稻 basmati 的结果, 本文未作分析。  
2. 台北 309 的 *hph* 基因 Southern blot, 标记分子量为 1.1kb. 3. 秋光 *ps1-barnase* 基因 Southern blot, 标记分子量为 0.5kb. 4. 5. *barnase* 阳性转基因植株 (Q9) 的花粉。图 4 花粉的形态上不规则; 图 5 花粉不为 I-KI 染色。6. *barnase* 阳性转基因植株 (Q9) 的花药小而不开裂 (右), 对照品种秋光的花药大且开裂 (左)。7. *barnase* 阳性转基因雄性不育植株 (TB8), 自交完全不育。授以正常花粉后可以结实 (箭头所指)。8. 人工授以正常花粉后, *barnase* 阳性转基因植株所形成的杂种种子

## Explanation of Plate

1~3: Southern blot analysis of *ps1-barnase* and *hph* genes. *ps1:ps1-barnase* plasmid DNA; PG / *hph:pHintG* plasmid DNA; (-): negative control, DNA from non-transgenic plant; And the other lines are the DNAs from transgenic plants for testing.

1. Southern blot of *ps1-barnase* gene in Tai Pei 309. The molecular weight for marker is 0.5kb. B1 and B2 are from the transgenic plant in *indica* rice basmati-1. We did not describe them in this paper. 2. Southern blot of *hph* gene in Tai Pei 309. The molecular weight for marker is 1.1kb. 3. Southern blot of *ps1-barnase* gene in Qiu Guang. The molecular weight is 0.5kb. 4~5. The pollens from a positive transgenic plant for *ps1-barnase* gene (Q9). 4. The pollens were shrunk; 5. The pollens were not stained by I-KI solution. 6. The anthers (right) from Q9 a positive transgenic plant for *ps1-barnase* gene were smaller and did not split. The ones from control plant (left), larger and split when the plant flowering. 7. The positive transgenic plant for *ps1-barnase* gene. (TP8) was not set seed in the condition of self-pollination. But set seeds (arrowhead) when the normal pollens, were pollinated. 8. The seeds were set in the a positive transgenic plant for *ps1-barnase* gene (TP8) when the pollens from normal non-transgenic plant were pollinated

凌定厚等: 以基因枪介导获转 *ps1-barnase* 基因的工程雄性不育水稻植株

图版 I

LING Ding-hou *et al*: Engineered Male Sterile Transgenic Plants of Rice (*Oryza sativa* L.) with *ps1-barnase* Gene Transformation by Particle Bombardment

Plate I

