

·学科进展·

中国的植物转基因雄性不育研究

张爱民* 肖兴国† 聂秀玲*

(* 中国农业大学植物遗传育种系,北京 100094;

† 中国农业大学生物学院农业部植物生理生化开放重点实验室,北京 100094)

[摘要] 从花药或花粉特异表达启动子的克隆、Mariani 方法、变通 Mariani 方法及反转基因技术等方面综述了我国转基因植物雄性不育的研究进展。

[关键词] 工程雄性不育,人工雄性不育,遗传转化,作物

引言

自 1930 年以来,开发和利用作物杂种优势对世界粮食生产的增加作出了重大的贡献。作物杂交种在产量,最终产品品质,抗病虫害性及对环境的适应性等方面具有杂种优势。例如,杂交水稻。杂交水稻在中国的种植面积占水稻种植面积的 50%—55%,同常规水稻品种相比增产 20%—30%。著名的杂交水稻品种籼优 63 在 1995 年曾创 13.9t/ha 的高产记录^[1]。目前,应用杂交种的作物包括水稻,玉米,油菜,棉花,甜菜,向日葵及大多数蔬菜作物。Pingali 认为,在 21 世纪的前 20 年,作物杂交种仍然是作物增产的主要因素^[2]。

无论对于自花授粉作物或异花授粉作物杂交种子的生产,雄性不育都是非常必要的。从雄性不育的分类上来讲,有细胞质雄性不育,核基因雄性不育(包括温敏和光敏雄性不育),生理雄性不育(指应用物理或化学方法诱导的雄性不育)。随着生物技术的发展及其在植物遗传育种中的应用,Mariani 等人在 1990 年开创了一个创造植物雄性不育的新途径-遗传工程雄性不育^[3],随后他们实现了遗传工程雄性不育保持和恢复^[4]。从此以后,世界各国和中国都相继开展了遗传工程雄性不育的研究。中国最早发表关于遗传工程雄性不育的论文是在 Mariani 工作的 5 年之后的 1995 年^[5,6]。

1 花药或花粉特异表达启动子的克隆

转基因雄性不育及其恢复的一个关键是花药或

花粉特异表达启动子,花药或花粉特异表达启动子可以直接驱动人工雄性不育基因在花药或花药内的特异表达而对雌蕊和其他器官没有影响。根据文献和未发表资料,中国科技工作者已先后分离、克隆和测序了 TA29^[5,7-9],ZM13^[10,11],S1^[12,13],A9^[14],wOsg6b 等花药或花粉特异表达的启动子(表 1)。

李胜国等人^[5]用 PCR 方法直接从烟草基因组 DNA 中分离出 TA29,得到 1.5 kb 的片断,测序结果表明,所克隆的 TA29 基因片断两端 280 bp 区段的碱基序列与已报道的序列完全相同。后经转化离体组织测定证明该启动子具有花药特异启动活性。彭仁旺等^[7]同样使用 PCR 方法,从烟草基因组 DNA 中扩增出 TA29 上游区域的调节区域,扩增得到的片断为 1303bp,含有全部花药特异表达的调节信息。张宏等人^[9]利用特异引物的 PCR 方法,从烟草幼苗分离出 TA29 启动子片断,该片断仅有 0.3kb,但含有花药特异表达的 -207-85 的序列,转化试验证明片断为花药特异启动子。

刘大文^[14]用 PCR 方法从拟南芥基因组 DNA 中分离出 A9 启动子,序列分析说明克隆的片断含有 364 对碱基,同已报道的 A9 启动子同源性为 99.2%,转化试验证明 A9 仅在花药中特异启动。

WOsg6B 可能是第一个报道的从小麦基因组 DNA 中扩增得到的花药特异启动子,罗玉英根据水稻花药特异启动子 Osg6B 的序列设计特异引物从小麦基因组中扩增分离出 wOsg6B(私人通信),构建人工嵌合基因 wOsg6B::GUS 并转化烟草,证明 wOsg6B

本文于 2000 年 2 月 16 日收到。

是花药特异表达的启动子。

空的分析,为创造转基因雄性不育奠定了基础。

以上各种花药特异表达启动子的克隆及表达时

表 1 花药或花粉特异表达启动子的分离和克隆

启动子	PCR 引物	片断大小(Kb)	参考文献
TA29	5'-引物 5'-ACACAATAGCCGGCTATAT-3' 3'-引物 5'-GCTTCGAATAGCTAATTTT-TTTAAGTAAAAAC-3'	1.5	[5]
TA29	5'-引物 5'-ACAGCTTCGTGTTTACGGGTGA-3' 3'-引物 5'-CGCCATGGTAGCTAATTTCTTTAAG-3'	1.3	[7]
TA29	5'-引物 5'-AGCTTGATAAGGTGGTGGCTG-3' 3'-引物 5'-GTCCATGGATGTTGACTGTTACAC-3'	0.3	[9]
ZM13	5'-引物 5'-ACTATGCTAAATATCAGAAGC-3 3'-引物 5'-AAGCTTATTGCCGCCGGTGA-3'	0.44	[10]
ZM13	5'-引物 5'-CGGAAGCTTCGGCAAGACAGCAGC-3' 3'-引物 5'-TCGGAGGAAAAGGGCCGTACCTT-3'	1.06	[11]
A9	5'-引物 5'-TATGTTAACCCTAATCAAGC-3' 3'-引物 5'-AGAGGTACCATTCTAATTAGA-3'	0.35	[14]
wOsg6b	5'-引物 5'-GCGCAAGCTTTTACACAGTTCAAAGTC-3' 3'-引物 5'-CCAGGATCCTAGCTAAATGTGGATTAG-3'	1.7	

2 Mariani 方法的转基因雄性不育

利用遗传工程创造作物雄性不育有多种途径,包括绒毡层和花粉特异表达细胞毒素,获得雄性不育;提早降解四分体间的胼胝质壁,破坏花药的发育;通过反义 RNA 技术创造雄性不育;基因的共抑制,导致雄性不育;干扰核基因和线粒体基因之间的通讯,造成雄性不育;导入细菌的组成性基因,引起植物器官发育异常以及条件雄性不育等。这里把绒毡层和花粉特异表达细胞毒素,获得雄性不育称为 Mariani 方法,因为 Mariani 首次应用该方法创造了基因工程雄性不育。将中国得到的转基因雄性不育植物列于表 2,由表 2 可见,多数是按照 Mariani 方法获得的。

表 2 中国已有的转基因雄性不育植物

作物种类	雄性不育基因	参考文献
玉米	TA29::Barnase	[14]
	A9::Barnase	[14]
油菜	TA29::Barnase	[7]
马铃薯	LAT52::Anti-protein kinase gene	[24]
水稻	PstI::Barnase	[9]
芝麻	TA29/Barnase	[16]
高粱	Anti-RNA of HSP70	[5]
烟草	TA29::Barnase	[5]
	PstI::Barnase	[4]
	TA29::Anti-actin	[7]
番茄	TA29::Barnase	[9]
	TA29::anti-actin	[9]
小麦	TA29::Barnase	[8]
	TA29::anti-actin	[14,27]

李胜国等人^[5]通过融合 TA29 和 Banarse 以及 TA29 和 Bastar 构建了人工雄性不育基因和恢复基因,转化烟草,他们发现 11 个转化株有 7 株在温度为 20℃时表现为雄性不育,9 个转基因植株在 26℃时表现雄性可育。获得了转基因雄性不育烟草。罗玉英等人^[15]研究了转基因雄性不育烟草绒毡层和花粉的发育过程,证明外源基因在花药的特异表达导致绒毡层细胞的提前降解而导致雄性不育。

陈占宽等人^[16]用基因枪方法将人工雄性不育基因 TA29::Barnase 和选择标志基因 Bar 转化到芝麻品种豫芝 4 号的离体子叶中,经 Southern 杂交鉴定在 3 株发育良好的再生植株中有 2 株为转基因株,表明目的基因已整合到该芝麻株系的核基因组中。他们表明将对这 2 株的雄性不育性进行进一步观察,但未见到其后续报道。

周雪荣等人^[17]将构建的雄性不育嵌合基因 TA29::Barnase 转化双低油菜品种“中双 821”,他们观察到转化株的花丝较短,花药畸形瘦瘪,最后不能够产生蒴果和种子,但是转化株的株高,生长速率,其他花器的形态以及花色和未转化株相同。他们的结果表明转化株是完全雄性不育的,对花药进行组织切片分析证明转化的 Barnase 基因破坏了绒毡层细胞,最终导致花粉发育不良和雄性不育。

傅荣昭等人^[18]报道了他们转基因小麦雄性不育的初步研究结果。他们构建了 TA29::Banarse 并用基因枪方法将其转化到豫麦 18 的幼胚中,在含有 Basta(5—10 mg/L)的培养基上筛选愈伤组织。转化

170个幼胚,获得6个再生植株,分子杂交证明其中3株带有目标基因,然而,转化株的育性如何,特别是雄性的育性如何未见后续报道。

张宏^[9]同样构建人工雄性不育基因 TA29::Barnase,用浓杆菌介导法转化番茄子叶,获得了具有雄性不育特征得转化株,转化株在株高、叶片、叶型及大小等方面均与未转化株相同,但在花的形状上有明显区别,一部分转化株在花瓣未展开时雄蕊即凋萎,花器里只剩下花萼和柱头。作者提出将对育性稳定性等进行后续研究。

刘大文^[14]用基因枪将人工嵌合雄性不育基因 TA29::Barnase 转化到两个玉米杂交种的胚性愈伤组织中,通过含有除草剂的培养基的筛选,获得20个抗除草剂的愈伤。对随机选择的6株诱导分化成苗的植株进行PCR检测,结果表明3株带有目标基因,但植株的育性如何没有报道。

以上转基因植物雄性不育都是按照 Mariani 的方法进行的,虽然自己克隆了启动子和目标基因 Barnase,但最终都不具有知识产权。克隆新的目标基因,特别是具有独立知识产权的基因的研究显得非常重要。

3 变通 Mariani 方法的转基因植物雄性不育

变通 Mariani 方法主要指采用与 TA29 不同的花药或毡绒层特异启动子来构建人工雄性不育基因。采用变通的方法,中国已获得玉米和水稻的转基因雄性不育。

Zou 等人^[13]构建了由来自水稻的花粉特异表达启动子和 Barnase 组成的人工嵌合雄性不育基因,后转化烟草获得雄性不育株^[13]。凌定厚等人^[17]以 ps-1::Barnase 为目的基因,转化水稻品种台北 309 及秋光,得到了转基因雄性不育株。研究表明转基因株的其他主要农艺形状与供体亲本无差异,但表现不育。不育株的不育程度分为3种类型:完全雄性不育的占 40.6%,高不育占 15.6%,低不育占 43.7%。完全不育株的花粉外观皱缩,形状不规则,不能被 I-IK 染色,但做母本与其他品种杂交结实正常,说明转化株雌性育性正常,不受转化的影响。

刘大文等人^[11]分离克隆了花药特异启动子 A9 并构建了嵌合雄性不育基因 A9::Barnase。用基因枪法转化两个玉米杂交种的胚性愈伤组织,通过抗除草剂的培养基筛选,从 11 个抗除草剂的愈伤获得 20 余株再生植株,PCR 检测其中 6 株表明 2 株带有目标基因 Barnase。正在对转化株的育性进行进一步

研究。

4 利用反义基因技术获得转基因雄性不育

雄配子的正常发育涉及到大约 20 000 多个基因和大量的酶。但在花粉发育过程中,孢子体和配子体的基因表达具有重迭性。从毡绒层形成,减数分裂,花粉形成到花粉萌发和花粉管的伸长,每一步都需要正确的和正常顺序的基因表达和酶的调节。换句话说,这些基因任何一个的不正确表达或不按顺序表达都可能影响雄配子的正常发育。阻断其过程中任何一个基因或者使其失活均能导致配子体发育失常,最终造成雄性不育^[20-22]。反义基因技术是阻断花粉或花药中基因的正常表达而诱导雄性不育的策略。这项技术由 van der Krol 等人^[23]于 1988 年和 van der Meer 等人^[24]1992 年首先提出。继 van der Meer 等人 1992 年的工作之后,我国科技工作者利用反义基因技术成功地创造了马铃薯,高粱,番茄,烟草,小麦等转基因雄性不育。

Liu 等人^[25]从马铃薯 cDNA 文库中分离出一个 cDNA 克隆,这个克隆称为 SBPK (Solanum berthaultii protein kinase),将这个基因的反义基因和花粉特异表达的启动子 LAT52 结合构建了嵌合基因并转化马铃薯。获得两种类型的转化体,一种表现典型的反义表型,另外一种表现为共抑制。两种类型都降低花粉的育性。结果表明当花药中蛋白激酶基因的表达受到反义蛋白激酶基因的抑制能导致转基因株的雄性不育。

陈建南等人^[26]将反义的 HSP70 在高粱花粉母细胞时期注射到高粱的幼穗中,对育性的观察表明育性降低了 27.6%,即 27.6%的雄性不育。试验表明反义的 RNA 也可以抑制花粉的正常形成而导致雄性不育。

李艳红等人^[27,28]构建了反义肌动蛋白基因和花药特异启动子 TA29 组成的嵌合雄性不育基因,通过浓杆菌介导途径,基因枪方法和花粉管途径将该基因转化番茄,烟草和小麦。在小麦中,转化株的花粉育性通过 I-IK 和 FDA 染色及蛋白标定,结果表明转化株表现不同程度的雄性不育,其中 60%转化株表现完全雄性不育。转化株和对照株在花器形态上有明显区别,转化株表现为花丝较短,花药瘦瘪。转化株自交不结实但用作母本进行杂交结实正常。在番茄和烟草中得到类似的结果。结果说明肌动蛋白在花药和花粉发育中的重要性。这也是第一例中国具有独立知识产权的转基因雄性不育。

5 小 结

中国近年来在基因工程植物雄性不育和杂种优势开发研究中取得了引人瞩目的成果,在单子叶植物和双子叶植物均获得转基因雄性不育,并且研究从模式植物转向具有重要经济价值的作物,特别是杂种优势利用相对较落后的主要粮食作物如小麦。与国外相比,中国更应注意创新,注重有知识产权的新基因的研究开发。预计在今后的5年内,特别是在中国国家转基因植物专项的支持下,将有更多的花粉花药特异启动子被分离和克隆,转基因雄性不育的作物如油菜,棉花,大豆,小麦等将有可能应用于作物杂交种子的生产。

参 考 文 献

- [1] 谢华安. 杂交稻恢复系明恢63的选育与利用. 福州:福建科学技术出版社, 1999.
- [2] Pingali P L. Role of heterosis in meeting world cereal demand in the 21st century In: The genetics and exploitation of heterosis in crops. ASA, CAAS, CIMMYT, Wisconsin, USA, 1999, 493—500.
- [3] Mariani C, De Beuckeleer M, Truettner M et al. Induction of male sterility in plants by a chimeric ribonuclease gene. *Nature*, 1990, **347**: 737—741.
- [4] Mariani C, Gossele V, De Beuckeleer M et al. A chimeric ribonuclease inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature*, 1992, **357**:384—387.
- [5] 李胜国,刘玉乐,康良仪等. 烟草花药特异启动子的克隆,活性测定及雄性不育基因及恢复基因的构建. *农业生物技术学报*, 1995, **3**(3):25—32.
- [6] 李胜国,刘玉乐,朱峰等. 基因工程雄性不育烟草的获得. *植物学报*, 1995, **37**(8):659—660.
- [7] 彭仁旺,周雪荣,周奕华等. 烟草花药特异表达基因启动子的克隆及序列分析. *生物工程学报*, 1996, **12**(3):247—250.
- [8] Cao Guangcheng, Sun Yongru, Chen Zhankuan et al. The cloning and construction study of artificial sterile gene and restore gene. *Scientia Agricultura Sinica*, 1996, **29**(3):20—26.
- [9] 张宏,王波,薛爱群等. 雄性不育嵌合基因的构建及番茄转化研究. *遗传*, 1998, **20**(3):5—7.
- [10] Pan Zhaoming, Liu Yule, Li Shengguo et al. Cloning and activity of a pollen specific promoter ZM13 in Maize. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1997, **5**(2):203—204.
- [11] Zhou Xueyong. Transfer of GFM CryIA gene into maize and the cloning of the ZM13 pollen-specific promoter. Ph.D dissertation of China Agricultural University, 1998.
- [12] Zou J T, Zhan X Y, Wu H M et al. Characterization of a rice pollen-specific gene and its expression. *Amer J Bot.*, 1994, **81**(5):552—561.
- [13] Zhan X Y, Wu H M, Cheung A Y et al. Nuclear male sterility induced by pollen-specific expression of a ribonuclease. *Sex plant Reprod.*, 1996, **9**(1):35—43.
- [14] 刘大文. 玉米雄性不育性基因工程研究. 中国农业大学博士学位论文, 北京, 1999.
- [15] 罗玉英,刘玉乐,李胜国等. TA29-Barnase嵌合基因导入对烟草花药绒毡层及花粉发育的影响. *植物学报*, 1997, **39**(10):894—898.
- [16] 陈占宽,邳玉宝,易明林等. 芝麻人工构建雄性不育基因的转化研究初报. *华北农学报*, 1996, **11**(4):33—38.
- [17] 周雪荣,彭仁旺,方荣祥等. 表达核糖核酸酶基因的雄性不育油菜的获得. *遗传学报*, 1997, **24**(6):531—536.
- [18] 傅荣昭,曹光诚,马江生等. 用基因枪法将人工雄性不育基因导入小麦的研究初报. *遗传学报*, 1997, **24**(4):358—361.
- [19] 凌定厚,陶利珍,马镇荣等. 以基因枪介导获转 ps1-barnase 基因的工程雄性不育水稻植株. *遗传学报*, 1998, **25**(5):433—442.
- [20] 李艳红,赵广荣,聂秀玲等. 利用基因工程创造核雄性不育小麦的研究进展. 见:Hybrid wheat—a new crop going to farmer, China Agricultural University Press, 1998, 197—203.
- [21] Shao Li, Li Yi, Yang Meizhu et al. Gene expression of chalcone synthase-A (CHSA) in flower colour alterations and male sterility in transgenic petunia. *Acta Botanica Sinica*, 1996, **38**(7):517—524.
- [22] 阎腾飞,刘国琴,肖兴国. 从花粉肌动蛋白作物雄性不育. *科学通报*, 1999, **44**(23).
- [23] van der Krol A R, Lenting P E, Veenstra J et al. An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature*, 1988, **333**:866—869.
- [24] van der Meer I M, Stam M E, van Tunen A J et al. Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. *Plant Cell* 1992, **4**:253—262.
- [25] Liu J Q, Richard Thompson, Ao G M. Antisense inhibition of an anther-expressed protein kinase gene leads to male sterility in transgenic plants. *Proceedings for the Sino-Korean symposium on agricultural biotechnology*, Suwon, Korea, 1996.
- [26] 陈建南,傅鸿仪,路子显等. HSP70反义RNA对高粱花粉正常形成的影响. *科学通报*, 1997, **42**(18):1993—1996.
- [27] 李艳红,肖兴国,赵广荣等. 将新的人工雄性不育基因导入小麦栽培品种的研究初报. *农业生物技术学报*, 1999, **7**(3):255—258.
- [28] 赵广荣. 通过基因工程创造番茄和烟草雄性不育性的研究. 西南农业大学博士学位论文, 1999.

TRANSGENIC PLANT MALE STERILITY IN PR CHINA

Zhang Aimin* Xiao Xingguo† Nie Xiuling*

(* Department of Plant Genetics and Breeding, China Agri. Uni, Beijing 100094;

† College of Biology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract Since 1990, biotechnology for hybrid crop breeding has been emphasized by geneticist and plant breeder and different system of genetic engineering for crop fertility control has been adopted to hybrid breeding program of rice, corn, wheat, tobacco, oilseed, sesame, tomato and so on in PR China. The paper reviews the status of transgenic male sterility in crops in China.

Key words male sterility, genetic transformation, crops

·资料·信息·

国家自然科学基金委员会召开四届一次全委会

国家自然科学基金委员会四届一次全体委员会于2000年3月20—21日在北京举行。24位委员出席了会议。有关部门负责同志朱丽兰、张玉台、韦钰、李学勇、陈宜瑜、王淀佐等出席了全委会开幕式、国家自然科学基金委员会名誉主任、顾问和监督委员会委员以及各科学部、局(室)负责同志列席了会议。

会议期间,中共中央政治局常委、国务院副总理李岚清邀请全委会委员和与会院士进行座谈并发表重要讲话。他说,党和国家对基础研究十分重视,江泽民同志近年来关于基础研究发表了一系列重要讲话和批示,国家加大了对基础研究的投入,基础研究的战略地位不断得到提高。发展基础研究,获得世界一流的基础研究成果,要着力抓好源头创新。国家自然科学基金委员会要着力营造有利于创新的研究环境。要重视学科建设,完善和发展具有中国特色、符合当代科学发展趋势的基础研究学科体系。

朱丽兰同志代表科学技术部在开幕式上发表了重要讲话。她充分肯定了科学基金制的成功实践和取得的显著成绩,阐述了国家自然科学基金在国家创新体系建设中的定位,强调应发挥基金制的优势,为我国科技源头创新营造良好的环境。

陈佳洱同志作了题为《完善发展科学基金制迎接新世纪的挑战》的报告,王乃彦同志作了《国家自然科学基金委员会1999年度财务工作报告》,朱道本同志作了《关于国家自然科学基金“十五”计划

和2010年远景规划制定工作的报告》,朱作言同志作了《关于国家自然科学基金“十五”优先资助领域战略研究进展的报告》,梁栋材同志作了《国家自然科学基金委员会监督委员会1999年度工作报告》。会议围绕陈佳洱等同志的报告进行了认真讨论和审议,大家一致认为,要认真贯彻江泽民主席关于基础研究的一系列重要论述和国家科教领导小组对科学基金工作的重要指标,按照“有所为,有所不为”的方针,在有创新潜力的项目方面多下功夫,力争在生命科学、信息科学技术等重要领域有所突破,同时要在促进国家经济发展方面发挥更大的作用;要进一步完善“公平竞争,科学民主,鼓励创新”的机制,力争在源头创新方面有所作为,培养和造就更多的高层次科技人才,提高我国基础研究的创新能力和整体水平,推进知识创新与技术创新的结合,在国家创新体系建设中发挥应有的作用。

会议同意陈佳洱同志代表委务会议提出的工作总体思路和拟采取的新举措。

委员们还提出了其他一些具体意见和建议,拟分别整理研究,有的在基金工作中注意改进和落实,有的将以适当形式上报或向有关部门反映。

会议强调,科学基金工作要按照全委会的要求,进一步提高科学基金管理水平,全面落实全委会提出的各项工作任务,为促进基础研究发展和推动国家创新体系建设作出更大贡献。

(办公室 供稿)